

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR
PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO:
INFLUÊNCIA NO METABOLISMO E TRANSPORTE
CELULAR**

Kaetillyn Araújo Diniz da Silva

Médica Veterinária

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR
PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO:
INFLUÊNCIA NO METABOLISMO E TRANSPORTE
CELULAR.**

Kaetillyn Araújo Diniz da Silva

Orientador: profa. Dra. Danila Barreiro Campos

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Ciência Animal do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

2015


KAETILLYN ARAÚJO DINIZ DA SILVA

**MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR
PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO:
INFLUÊNCIA NO METABOLISMO E TRANSPORTE
CELULAR**

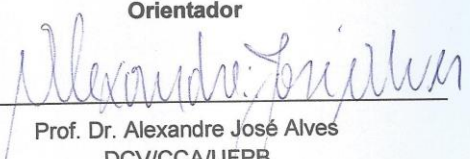
Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal do Centro de Ciências
Agrárias da Universidade Federal da
Paraíba, como parte das exigências
para a obtenção do título de Mestre
em Ciência Animal. Área de
Concentração Saúde Animal do brejo
paraibano.

APROVADA EM 14/12/2015


BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Danila Barreiro Campos
DCV/CCA/UFPB
Orientador



Prof. Dr. Alexandre José Alves
DCV/CCA/UFPB
Examinador



Prof. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo
UAMV/CSTR/UFCG
Examinador

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KAETILLYN ARAÚJO DINIZ DA SILVA - Nascida no dia 16 de julho de 1988, em Cabedelo município do estado da Paraíba. Concluiu o ensino médio no Colégio Estadual Dom Luciano José Cabral Duarte na cidade de Aracaju capital do estado de Sergipe, no ano de 2005. Em 2006.2 ingressou no curso de medicina veterinária pela Faculdade Pio Décimo, como bolsista integral do Programa Universidade para Todos (PROUNI), concluindo o curso em agosto de 2011. No mês de março de 2014 iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal na Universidade Federal da Paraíba.

“Tudo quanto te vier às mãos para fazer, faze-o conforme as tuas forças, porque na sepultura, para onde tu vais, não há atividade nem planejamento, não há conhecimento nem sabedoria.”

(Salomão - Ec 9: 10)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Manoel Gomes da Silva (*in memorian*) e Dacylete Araújo Diniz da Silva, muito obrigada pelo incentivo e dedicação incondicional, por não medirem esforços na realização de um sonho que se tornou possível.

Ao meu padrasto José da Silva Filho (*in memorian*), sua sabedoria e seus conselhos ficarão eternizados em minha memória, assim como senhor. Mais que um pai de coração, tornou-se um de meus melhores amigos.

A minha querida irmã Quelita Araújo Diniz da Silva, seu apoio e parceria são combustíveis para mim. Sei que posso recorrer a você em qualquer situação.

Ao meu marido Diego Oliveira da Costa, por seu carinho e principalmente, por sua compreensão. Por tornar minha vida um pouco mais doce.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, sem Ele, nada existiria;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAn) pela oportunidade;

A minha orientadora Danila B. Campos que prontamente me auxiliou em todas as etapas de desenvolvimento deste projeto, mostrando dedicação e zelo à arte de ensinar;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (PPGCAn) pelo ensino de qualidade;

Aos técnicos e demais funcionários dos laboratórios do Hospital Veterinário da UFPB pela disposição em ajudar;

Aos colegas de pós-graduação, em especial Guilherme, Michele, Laysa, Beatriz, Glenison, Harlan, Maria e Edijanio pela parceria construída;

Aos monitores de Anatomia Animal do curso de zootecnia, Kelvis e Eugênio pela troca de conhecimentos e pela amizade conquistada;

A minha querida avó Giuvanice que se tornou um porto seguro enquanto estive longe de casa, pela dedicação e carinho dispensados a mim durante todo este tempo.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| LISTA DE TABELAS | i |
| LISTA DE FIGURAS | ii |
| RESUMO GERAL | iv |
| ABSTRACT | v |
| CONCISERAÇÕES GERAIS | 1 |
| 1. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO..... | 3 |
| 2. IMPLANTAÇÃO..... | 5 |
| 3. INTERAÇÃO MATERNO-FETAL..... | 6 |
| 4. PLACENTAÇÃO..... | 9 |
| 5. FERTILIZAÇÃO <i>IN VITRO</i> (FIV)..... | 12 |
| 6. FALHAS GESTACIONAIS..... | 13 |
| 7. EXPRESSÃO GÊNICA..... | 15 |
| 7.1 EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS 1 (AQP11)..... | 16 |
| 7.2 EXPRESSÃO DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE 2 ^a 1 (SLC2A1)..... | 17 |
| 7.3 EXPRESSÃO DA CLINICA AMIDINOTRANSFERASE (L-ARGININA CLICINA AMIDINOTRANSFERASE) GATM..... | 19 |
| OBJETIVO E JUSTIFICATIVA | 21 |
| CAPITULO 1 – MODULATION OF CARUNCULAR GENE EXPRESSION BY BOVINE EMBRYO DURING PLACENTATION: INFLUENCE ON METABOLISM AND CELLULAR TRANSPORT..... | 22 |
| REFERENCES | 35 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 43 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS | 44 |

LISTA DE TABELAS

MODULATION OF CARUNCULAR GENE EXPRESSION BY BOVINE EMBRYO DURING PLACENTATION: INFLUENCE ON METABOLISM AND CELLULAR TRANSPORT.

Página

| | |
|---|----|
| Table 1. Details of the oligonucleotides used in real time PCR. | 28 |
|---|----|

LISTA DE FIGURAS

MODULATION OF CARUNCULAR GENE EXPRESSION BY BOVINE EMBRYO DURING PLACENTATION: INFLUENCE ON METABOLISM AND CELLULAR TRANSPORT.

Página

Figure 1. Relative levels of *AQP1* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars). A higher expression of *AQP1* ($p < 0.05$) was observed in cotyledon-associated caruncles at 30 and 35 days in AI gestation. However, there was a decrease of *AQP1* expression in cotyledon-associated caruncles at 35 days in IVF pregnancies. Different letters represent significant differences on average between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P < 0.05$) in the same gestational age. AI: Artificial insemination; IVF: In vitro fertilization.....29

Figure 2. Relative levels of *AQP11* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars). There was a higher *AQP11* expression at 30, 35 and 40 days of AI pregnancies. *AQP11* transcription demonstrated the same pattern in IVF gestations. The different letters represent the significant disparity on average levels between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P < 0.05$) at the same gestational age. AI: artificial insemination; IVF: *in vitro* fertilization.....30

Figure 3. Relative levels of *SLC2A1* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars). *SLC2A1* transcripts were higher in cotyledon-associated caruncles at 30 and 40 days in AI gestations. No differences between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn were detected concerning the *SLC2A1* expression in IVF gestations. The different letters represent the

significant disparity on average levels between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P < 0,05$) at the same gestational age. The asterisks demonstrate significant differences between AI and IVF ($p < 0,05$) averages at the same gestational age. AI: artificial insemination; IVF: *in vitro* fertilization.....30

Figure 4. Relative levels of *GATM* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars). *GATM* presented lower expression in cotyledon-associated caruncles during all analyzed periodo (30, 35 and 40 days) in AI pregnancies. In IVF gestations, the lowest expression of the *GATM* was observed only at 40 days in cotyledon-associated caruncles. The different letters represent the significant disparity on average levels between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P < 0,05$) at the same gestational age. AI: artificial insemination; IVF: *in vitro* fertilization.....31

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO: INFLUÊNCIA NO METABOLISMO E TRANSPORTE CELULAR.

RESUMO GERAL – Apesar da intensa evolução biotécnica reprodutiva, ainda não é possível evitar falhas gestacionais. O início da gestação é o período crítico, pois está associado ao maior número de falhas no desenvolvimento da gestação. Em humanos, este número varia entre 15% e 19% em gestações espontâneas. Falhas na implantação são ainda maiores após a fertilização *in vitro*, chegando a perdas de 80 a 90% dos embriões em humanos. Nos bovinos, quando se considera gestações de embriões produzidos *in vitro* essas perdas são ainda mais expressivas. Embriões manipulados são mais propensos a falhas. Com objetivo de determinar a influência do embrião bovino sobre a expressão gênica de SLC2A1, AQP1, AQP11 e GATM na placenta, foram coletadas carúnculas do corno gestante e não gestante do útero de vacas submetidas à inseminação artificial (IA) e fertilização *in vitro* (FIV) aos 30, 35 e 40 dias de gestação. A expressão relativa dos genes foi determinada por qPCR em tempo real. Os genes foram selecionados de acordo com sua atividade no metabolismo e transporte celular. *AQP1* apresentou maior transcrição aos 30 e 35 dias em gestações IA, porém em gestações FIV, a expressão estava diminuída aos 35 dias em carúnculas do corno gestante. A expressão de *AQP11* esteve aumentada em carúnculas do corno gestante durante todo período analisado em gestações IA e FIV e *SLC2A1* apresentou maior expressão em carúnculas do corno gestante em gestações IA, no entanto, não houve diferenças significativas em gestações FIV, em carúnculas do corno gestante. O *GATM* apresentou menor expressão em carúnculas do corno gestante em todo período analisado em gestações IA, mas, essa menor expressão só foi observada aos 40 dias em gestações FIV. Os resultados indicam que o embrião modula a dinâmica da expressão gênica uterina durante a placentação e que a manipulação de embriões pode alterar o perfil de expressão gênica, neste período.

Palavras-chave: INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL; FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*; PERDAS GESTACIONAIS.

MODULAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA CARUNCULAR PELO EMBRIÃO BOVINO DURANTE A PLACENTAÇÃO: INFLUÊNCIA NO METABOLISMO E TRANSPORTE CELULAR.

ABSTRACT - Despite the intense evolution reproductive biotech pregnancy failures still can not be avoided. The beginning of pregnancy is a critical period because it is associated with a higher number of failures in the development of pregnancy. In humans, this number varies between 15% and 19% spontaneous pregnancies. Failures in the implantation are still higher after IVF, reaching losses of 80-90% of human embryos. In cattle, when considering pregnancies of *in vitro* produced embryos such losses are even more significant. Manipulated embryos are more prone to failure. In order to determine the influence of bovine embryo on gene expression of SLC2A1, AQP1, AQP11 and GATM in the placenta were collected cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn were collected of cows submitted to artificial insemination (AI) and *in vitro* fertilization (IVF) at 30, 35 and 40 days of gestation. The relative expression of the genes was determined by real time qPCR. The genes were selected according to their activity in metabolism and cellular transport. AQP1 showed higher transcript at 30 and 35 days in IA pregnancies, but in IVF pregnancies, the term was reduced to 35 days in cotyledon-associated caruncles horn. AQP11 expression was increased in cotyledon-associated caruncles horn throughout the analyzed period in AI and IVF pregnancies and SLC2A1 showed higher expression in cotyledon-associated caruncles in IA pregnancies, however, there were no significant differences in IVF pregnancies. GATM showed lower expression in cotyledon-associated caruncles throughout the analyzed period in IA pregnancies, but this lower expression was observed only after 40 days in IVF pregnancies. The results indicate that the embryo modulates the dynamics of uterine gene expression during placentation and the embryo manipulation can alter the gene expression profile in this period.

Keywords: ARTIFICIAL INSEMINATION; *IN VITRO* FERTILIZATION; GESTACIONAL LOSSES.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

O processo de fecundação ocorre no momento em que o gameta masculino se funde ao gameta feminino, ainda na tuba uterina, formando o zigoto. Após sucessivas clivagens, o embrião se desenvolve para fase de blastocisto quando cai no útero, nesta fase, o embrião é constituído por uma massa celular interna e uma cavidade central ou blastocoele rodeada por uma monocamada de células da trofotoderma (GUILLOMOT, 1994).

Para que haja sucesso na gestação, além de embriões saudáveis, é necessário que o ambiente uterino esteja livre de alterações que comprometam o desenvolvimento embrionário (EMILIANI et al., 2005). O concepto (embrião/feto e membranas extraembrionárias associadas) e o endométrio interagem reciprocamente durante toda a gestação (SPENCER et al., 2004). Esta comunicação inicial permite diferenciações morfológicas e funcionais no embrião e nas células do endométrio (OSTRUP et al., 2011).

A comunicação cruzada entre o embrião bovino e a mãe é iniciada quando o concepto emite sinais de sua presença no endométrio materno, secretando o interferon-tau (INFt). Isto acontece, simultaneamente com o período de alongamento do blastocisto para forma filamentosa, no décimo - sexto dia de gestação, ocupando o comprimento total do corno uterino (SPENCER et al., 2008). O INFt age impedindo a secreção de prostaglandina (PGF2a) induzida pela oxitocina no endométrio, evitando, assim, a luteólise, para assegurar a produção estável de progesterona pelo corpo lúteo, promovendo, assim, a manutenção da gestação (BAZER et al., 1997; ROBINSON et al., 2008).

Os principais locais de interação materno-fetal nos ruminantes são os placentomas, que são formados a partir da junção de carúnculas maternas e cotilédones fetais. Uma característica única da placenta sinepiteliocorial bovina é a presença de células trofoblásticas gigantes (CTGs), estas células são cruciais para a comunicação materno-fetal, à medida que migram e se fundem com as células epiteliais uterinas simples, liberando uma grande variedade de produtos, como

lactogênio placentário, para dentro do endométrio materno (HAMBRUCH et al., 2010).

O estabelecimento da placenta em mamíferos requer a interação entre a membrana corioalantóica e o tecido uterino materno (LEISER e KAUFMANN, 1993). Em placentas do tipo sinepiteliocorial ocorre limitada invasão de células fetais em direção ao endométrio materno, o epitélio uterino e os vasos sanguíneos maternos permanecem intactos durante a gestação (PEREIRA et al., 2013). Por isto, tais placentas são caracterizadas por possuir um contato materno-fetal consideravelmente menos intenso do que outros tipos de placenta (LEISER e KAUFMANN, 1993).

A implantação do embrião no endométrio uterino corresponde à fase crítica da gestação, pois a maioria das perdas embrionárias acontece nesse período (ISOM et al., 2013). Para evitar este alto índice de perdas é necessário além de um ambiente materno adequado, um diálogo materno-embriônico eficaz mediado por fatores bioquímicos, que permitem interações complexas durante a implantação, entre o embrião e o endométrio materno (EMILIANI et al., 2005).

Embriões produzidos por técnicas de reprodução assistida são submetidos a processos de manipulação e cultura de células e isto pode prejudicar o seu desenvolvimento e sinalização no endométrio (ZHOU et al., 2008), como consequência, estes embriões geralmente são menos aptos e mais propensos a falhas do que embriões produzidos in vivo (ISOM et al., 2013).

As perdas expressivas de gestações oriundas de FIV foram relatadas especialmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento do feto e da placenta, aproximadamente 30 e 90 dias de gestação (FARIN et al., 2006). Isto pode ser atribuído a falhas no desenvolvimento de membranas da placenta e, portanto, reduzido desenvolvimento dos vasos sanguíneos placentários (FARIN et al., 2006).

1. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO

A formação do zigoto é estabelecida pelo processo de fusão dos gametas feminino e masculino denominado fecundação. A partir deste momento, o embrião controlado por proteínas e RNAs herdados sofre ativação genômica em tempo específico (THOMPSON, 1996). Após, a iniciação pró-genômica, ainda na tuba uterina, o embrião sofre sucessivas clivagens, dando origem à mórula com 16 blastômeros, ainda rodeado pela zona pelúcida (OSTRUP et al., 2011). O embrião entra no útero e se desenvolve para a fase de blastocisto antes do início da implantação, independente da espécie (BAZER et al., 2009).

A partir do momento em que o embrião cai no útero até o início da implantação, o embrião não está ligado no útero e, é portanto, completamente depende das secreções uterinas para o seu desenvolvimento (SPENCER e BAZER, 2004). Por isso, a mãe produz um fluido uterino através das glândulas endometriais localizadas nas áreas intercarunculares (SPENCER e BAZER, 2004), conhecido como leite uterino ou histotrofo que compreende não só os nutrientes, mas também moléculas de sinalização incluindo fatores de crescimento, citocinas e hormônios, tanto de origem materna como embrionária para fins de comunicação bidirecional (FAZELI e PEWSEY, 2008).

O histotrofo é composto de proteínas, hidratos de carbono, açúcares, lípidos, e eletrólitos produzidos pelas glândulas endometriais que são necessários para nutrir o conceito (BELTMAN et al., 2014). Os componentes proteicos do histotrofo são importantes para a interação materno-fetal, especialmente durante os processos de alongamento do trofoblasto, reconhecimento da gestação, implantação e placentação (SPENCER et al., 2004). O histotrofo é absorvido pelo trofoblasto através aréolas que se desenvolvem ao longo das glândulas uterinas como áreas especializadas para a absorção e transporte de histotrofo no útero (ENDERS e CARTER, 2006). As aréolas são encontradas espalhadas pelo no córion liso da placenta bovina (OSTRUP et al., 2011).

O blastocisto formado após vários ciclos de divisão mitótica é composto por tecidos diferenciados (BAZER et al., 2009). A formação do blastocisto geralmente é iniciada logo após a entrada do conceito no útero, que ocorre cerca de quatro dias após a ovulação na vaca (OSTRUP et al., 2011). Nos mamíferos, o blastocisto é constituído por uma massa celular interna que dará origem ao embrião, uma cavidade denominada blastocele e uma monocamada de células que constituem a trofotoderma e dará origem a placenta (GUILLMOT, 1994).

É importante observar que o epitélio ectodérmico que cobre a superfície do blastocisto, conhecido como trofoblasto ou trofotoderma é extremamente versátil, com grande capacidade de invasão, fusão celular, produção hormonal, absorção de nutrientes específicos, transporte seletivo, metabolismo ativo e, finalmente, pela capacidade de resistir a um ataque imunológico materno (PETER, 2013).

Nos ungulados, a permanência da zona pelúcida no blastocisto permite sua livre flutuação no lúmen uterino por um período de tempo, onde é submetido a uma fase de rápido desenvolvimento que altera significativamente a morfologia do blastocisto antes da placentação (OSTRUP et al., 2011). Esta é a fase em que o blastocisto, uma estrutura esférica, evolui para uma forma ovóide e tubular, em seguida, alonga para forma filamentosa, no dia 12 em ovelhas e dia 15 em bovinos (SPENCER et al., 2008).

Segundo Spencer e colaboradores (2004), é provável que durante a fase de alongamento do blastocisto, inicie-se a diferenciação da massa celular interna em endoderma e mesoderma e a formação dos anexos embrionários. Quatro estruturas membranosas estão envolvidas na formação da placenta, são estas: cório, âmnio, alantóide e saco vitelino. O cório é uma camada epitelial derivada da parede do trofoblasto (LEISER e KAUFMANN, 1993). O âmnio é uma camada derivada do dobramento do ectoderma embrionário (LEISER e KAUFMANN, 1993). O alantóide é uma bexiga urinária extraembrionária que se desenvolve a partir do intestino caudal (LEISER e KAUFMANN, 1993). O saco vitelino se desenvolve como uma estrutura anexa, vascularizada, do intestino médio embrionário (LEISER e KAUFMANN, 1993).

O cório produz dobras que envolvem o embrião e forma um saco cheio de fluido, o âmnio, proporcionando um ambiente livre de restrições assimétricas para o desenvolvimento do embrião, além de oferecer, absorção de choque e resistência à compressão (PETER, 2013). Uma vez que o âmnio é formado, uma vesícula endodérmica cresce a partir da porção terminal do intestino embrionário para formar a vesícula alantóica, desde o seu início coberto por mesoderme. A alantóide é contínua com o sistema urogenital em desenvolvimento no embrião e atua como um sítio para a deposição de resíduos (PETER, 2013). À medida que a alantóide cresce através do exoceloma, entre 50 e 60 dias de gestação, ocorre uma fusão com o córion, que envolve o embrião para formar o corioalantóide (PETER, 2013).

Portanto, as membranas extraembrionárias se formam antes da implantação em ruminantes domésticos (SPENCER et al., 2004). No entanto, o blastocisto de roedores, primatas e primatas não humanos são implantados momentos antes da expansão do blastocelo, e as membranas extraembrionárias são formadas após a implantação (CARSON et al., 2000).

2. IMPLANTAÇÃO

Sob condições fisiológicas normais, o útero e a sua parte interna, referido como o endométrio, constituem o local materno para a implantação do embrião. O processo de implantação é conhecido como um passo crítico da gestação, pois está associado com uma alta taxa de perda de embriões em todas as espécies de mamíferos estudadas (DISKIN e MORRIS, 2008; ISOM et al., 2013).

A implantação é o processo em que o blastocisto fisicamente e fisiologicamente entra em contato íntimo com o útero materno (LEE e DEMAYO, 2004). O Desenvolvimento do blastocisto, implantação e manutenção da gestação requerem um diálogo materno-embrionário eficaz, mediado por fatores bioquímicos, como enzimas, uma variedade de fatores de crescimento e citocinas que permite as interações complexas entre o embrião e o endométrio materno durante a implantação (EMILIANI et al., 2005).

As fases de implantação incluem: rompimento da zona pelúcida; pré contato com o lúmen uterino; orientação; aposição; adesão do blastocisto. O rompimento da zona pelúcida é mediado por ação de lise enzimática no útero e/ou proteases embrionárias (SPENCER et al., 2004). Permite a adesão do blastocisto ao útero e está relacionado com o crescimento do blastocisto (SPENCER et al., 2004); Pré-contato e orientação do blastocisto, é um período em que blastocistos podem migrar e passam por orientação sem contato celular definitivo entre o trofotoderma do concepto e o epitélio endometrial, nesta fase, inicia-se o reconhecimento materno da gestação (BAZER et al., 2009); A posição do blastocisto no corno uterino é central em espécies caracterizadas por grande expansão do blastocisto pois, o mesmo é capaz de crescer e formar uma grande superfície de contato suficiente para se fundir com o epitélio luminal uterino, sem penetrar através dele (LEE e DEMAIO, 2004). Em placentas sinepiteliocorial, a aposição envolve a fusão de cotilédones da placenta com carúnculas endometriais para formar placentomas, estes são os locais de implantação e possuem importância primordial na troca gasosa materno-fetal e fornecimento de nutrientes para placenta (SPENCER et al., 2004); Adesão e interdigitação do trofotoderma com o epitélio luminal uterino ocorre tanto nas áreas carunculares e intercarunculares do endométrio, formadas a partir da migração e fusão de células trofoblásticas binucleadas gigantes com as do epitélio endometrial. A adesão é primeiramente mediada por moléculas que promovem ligações específicas, tais como selectinas, galectinas e proteoglicanos de sulfato de heparano (CARSON et al., 2000). As interações de baixa afinidade iniciais são seguidas por uma aderência mais estável entre o trofoblasto e endométrio mediada por integrinas (OSTRUP et al., 2011). Blastocistos bovinos não exibem implantação invasiva (BAZER et al., 2009).

3. INTERAÇÃO MATERNO-FETAL

A placenta sinepiteliocorial presente em bovinos é o tipo de placenta mais complexa entre os mamíferos, pois diferentes áreas podem possuir diferentes níveis de interação materno-fetal (PEREIRA et al., 2013), além disso, possui limitada

invasão de células fetais no endométrio materno, pois as células trofoblásticas gigantes binucleadas (CTGs) não ultrapassam a barreira epitelial basal (WOODING, 1992; PEREIRA et al., 2013). Segundo Spencer et al., (2008), as CTGs possuem pelo menos duas funções principais: formação de um sincício materno-fetal híbrido para que ocorra uma implantação bem sucedida e, subsequente crescimento cotiledonar no placentoma e; síntese e secreção de proteínas e hormônios esteróides.

As CTGs desenvolvem-se a partir de células trofoblásticas uninucleadas (CTUs) e formam de 15% a 20% da trofotoderma durante toda a gestação. As CTGs são caracterizadas por produzir grande quantidade de grânulos delimitados por uma membrana, e provavelmente, em 97% dos casos, dois núcleos (BJÖRKMAN, 1968; PETER, 2013). As CTGs migram para fora do trofotoderma e fundem-se com o epitélio uterino, formando células trinucleadas híbridas na interface endometrial (PETER et al., 2013).

Estas células ultrapassam a junção microvilar para liberação dos grânulos na circulação materna que posteriormente é reestabelecida, logo após, estas células morrem e são reabsorvidas pela CTU (PETER et al., 2013). Estes grânulos possuem lactogênio placentário (WOODING e BECKERS 1987; NAKANO et al., 2002) e outros hormônios como progesterona (REIMERS et al., 1985), estrógenos e prostaglandinas (GROSS e WILLIAMS, 1988) produzidos pelas CTGs (PETER, 2013). O lactogênio placentário atua sobre as glândulas endometriais do útero para estimular o seu desenvolvimento e a expressão de genes que codificam proteínas secretadas (SPENCER et al., 2004)

As CTUs e CGTs também sintetizam glicoproteínas associadas à gestação (GAPs) (PETER, 2013). Estas possuem um importante papel como mediadores nos processos relacionados com o reconhecimento materno da gestação e se faz necessário uma análise mais aprofundada do seu papel no desenvolvimento do conceito (MAMO et al., 2011). As GAPs, o lactogênio placentário e as proteínas relacionadas com a prolactina são detectáveis no soro materno a medida que a gestação avança (KESSLER et al., 1991; ALVAREZ-OXILEY et al., 2008), e a

detecção da sua presença na circulação materna é utilizada para o diagnóstico de gestação (PETER, 2013).

Para que haja a manutenção da gestação em mamíferos, é necessário um corpo lúteo funcional para produzir progesterona e dar suporte às funções secretoras do endométrio que sustentam o início do desenvolvimento embrionário, implantação e placentação (BAZER et al., 2009). A comunicação primária é essencial para o estabelecimento da gestação e envolve sinais enviados a partir do conceito para a mãe, permitindo a manutenção de um corpo lúteo funcional e início das modificações endometriais antes da implantação (GEISERT et al., 1992; SPENCER et al., 2004) esta comunicação inicial permite diferenciações morfológicas e funcionais no embrião e nas células do endométrio (OSTRUP et al., 2011).

A continuidade de um corpo lúteo, que produz de forma estável a progesterona em ruminantes é dependente da ação do interferon-tau (INFt), proteína produzida pelas células trofoblásticas uninucleadas do conceito alongado (PETER, 2013). O pico máximo de secreção de INFt pelo conceito ocorre no 16º ou 17º dia gestacional, concomitante com o reconhecimento materno da gestação em bovinos (BAZER et al., 1997; OSTRUP et al., 2011). O INFt age impedindo a secreção de prostaglandina (PGF2a) induzida pela oxitocina no endométrio, evitando assim a luteólise (BAZER et al., 1997; ROBINSON et al., 2008). INFt induz alterações na expressão de vários genes (genes estimulados por INF) que hipoteticamente regulam a receptividade uterina para implantação e o desenvolvimento do conceito (BAUERSACHS et al., 2008).

No endométrio bovino, um grande número de genes que são induzidos por INFs foram identificados (BAUERSACHS et al., 2006). A família de INF inclui o INF-tipo II, designado INFg, e diversos INFs do tipo I, incluindo o INFt (OSTRUP et al., 2011). As ações precisas de INFs mediadas pelo conceito não são conhecidos (OSTRUP et al., 2011). No entanto, tem sido sugerido que pode afetar a remodelação do endométrio para proteger o conceito alogênico de rejeição imunológica; determina o limite de invasão do endométrio pelo conceito; e / ou estimula o desenvolvimento da vasculatura uterina (BAZER et al., 2009).

Mamo et al., (2011), em um estudo comparativo de genes expressos na interface materna e fetal simultaneamente, durante o período de reconhecimento materno da gestação (16º dia gestacional), identificaram um total de 127 genes expressos no conceito para os quais seus respectivos receptores são expressos no tecido endometrial materno, sugerindo que moléculas adicionais derivadas de INFt podem modular o endométrio durante o reconhecimento da gestação (BAUERSACHS et al., 2012). Estes sítios de ligação podem ilustrar os possíveis núcleos de interações entre o conceito e tecido endometrial durante o período de reconhecimento materno da gestação (MAMO et al., 2011). A maioria dos sítios de ligação produzida por qualquer um dos dois tecidos se forma a partir da potente fusão aos seus respectivos receptores e/ou proteínas de ligação no outro tecido para regular/modular os seus papéis biológicos (MAMO et al., 2011).

Foram identificados 20 genes mais abundantes, específicos do conceito, dentre os quais, a maioria é estimulada pelo interferon (MANSOURI-ATTIA et al., 2009; FORDE et al., 2011). É possível que esses genes possam desempenhar papéis importantes na comunicação materno-fetal durante o reconhecimento materno da gestação e desenvolvimento do conceito (MAMO et al., 2011).

Uma consequência importante promovida pelo reconhecimento materno da gestação é a alteração da fisiologia materna para bloquear a ciclicidade ovariana e para assegurar que a produção de progesterona pelo corpo lúteo seja mantida (OSTRUP et al., 2011). Sem um fornecimento estável de progesterona, a gestação é interrompida (SIITERI et al., 1977). Com o avanço da gestação, após o desenvolvimento placentário, grande parte do suprimento de progesterona é sintetizado pela placenta, funcionando também, como um importante órgão endócrino durante este período.

4. PLACENTAÇÃO

A placentação inicia-se logo após a implantação do embrião, momento em que ocorre o desenvolvimento e associação de membranas fetais e tecido uterino

(BJÖRKMAN, 1976). A placenta é um órgão transitório formado por tecidos maternos e fetais, responsável pela transferência de grandes quantidades de substâncias entre as circulações materna e fetal, incluindo oxigênio, dióxido de carbono, água e todos os nutrientes necessários requeridos pelo feto, além de oferecer proteção imunológica e física e remoção de metabólitos (DESFORGES e SIBLEY, 2010).

O crescimento fetal é intimamente ligado às funções de troca da placenta e o tamanho do feto ao nascimento reflete diretamente a transferência positiva de líquidos e solutos através da placenta, no decurso da gestação (DESFORGES e SIBLEY, 2010). O tipo de placentação estabelecido nos animais domésticos e no homem está relacionado com as variações entre a adesão do embrião com o endométrio, pois essa interação vai de uma simples, porém firme adesão, até a completa erosão do endométrio (LEFEVRE et al., 2007).

A placenta corioalantóica encontrada em ruminantes resulta na fusão do córion avascular com a membrana alantóide vascularizada (FABER e THORNBURG, 1983). Na fase inicial da gestação em bovinos, o epitélio de ambas regiões caruncular e intercaruncular se apegam ao córion por interdigitação de microvilosidades para formar a placenta. Cada carúncula posteriormente cresce e rapidamente desenvolvem-se criptas para aumentar a área de superfície de contato, as carúnculas desenvolvem um extenso leito vascular e são responsáveis por realizar trocas gasosas e de pequenas moléculas. A região intercaruncular está envolvida principalmente com o fornecimento de moléculas de grandes dimensões para o embrião (ATKINSON et al., 1984). Este tipo de placenta apresenta perda mínima de tecido uterino após o parto, por isto, é classificada como adecídua (BJÖRKMAN, 1982). Uma de suas principais características, em comparação com outros tipos de placentas de mamífero, é um aumento da área de superfície na junção materno-fetal (MILES et al., 2004).

A placenta também é classificada como cotiledonária, devido à presença de carúnculas endometriais que são espessamentos subepiteliais do tecido uterino. As cacúnculas associam-se com os cotilédones fetais formando estruturas denominadas placentomas (LEISER e KAUFMANN, 1993). Estruturas carunculares também estão presentes em vacas não gestantes (RICI et al., 2011).

Cotilédones fetais fundem-se às carúnculas maternas para formar cerca de 70-120 placentomas que servem como a unidade funcional para troca materno-fetal (FORD, 2000). A formação dos placentomas inicia-se simultaneamente com a implantação, em torno do 20º dia de gestação na vaca, porém o íntimo contato ocorre após 30 dias de gestação, sendo os mais complexos, observados após o 42º dia de gestação (BAZER et al., 2009). Placentomas não são macroscopicamente observados até aproximadamente o 37 dias de gestação (PETER, 2013). Inicialmente, a partir de 37 a 40 dias gestacionais, um máximo de 20 placentomas estão presentes na superfície coriônica no embrião e, em torno de 40 a 50 dias de gestação, o número de placentomas triplica (PETER, 2013). Com o decorrer da gestação os placentomas aumentam de tamanho, variando em função do local que se encontram no útero (SCHLAFER et al., 2000).

A fusão entre carúnculas e cotilédones foi localizada em lugares aleatórios da placenta de bovinos, no entanto, é na linha antimesometrial, na região média da tuba uterina onde está localizada a maioria dos processos de fusão em gestações normais nos ruminantes (PEREIRA et al., 2006). Rici et al., (2011) mostraram em seu estudo que o aumento na quantidade de fusões ocorre predominantemente no corno gestante, independente da fase de gestação.

Em bovinos, os cotilédones fetais fundem-se às carúnculas maternas para formar cerca de 70-120 placentomas (FORD, 2000). Porém, São detectados menos placentomas em gestações de embriões produzidos *in vitro*, como em clones, sugerindo um retardo do crescimento feto / placentário e ainda um menor desenvolvimento caruncular (HASHIZUME et al., 2002). No entanto, mecanismos compensatórios podem se desenvolver (MILES et al., 2004).

Miles et al., (2004) comparando placentas de embriões produzidos *in vivo* e *in vitro*, observaram que a área total da superfície do endométrio foi maior para o grupo *in vivo*, porém, a percentagem de área de superfície de placentomas foi diminuída no grupo *in vitro*. Vilosidades fetais e volume de células binucleadas foram diminuídas em placentomas de embriões FIV. Em contraste, o volume de tecido proporcional de vasos sanguíneos em carúnculas maternas foi aumentado no grupo *in vitro*. Além disso, as proporções de volume de área de superfície dos vasos

sanguíneos nos placentomas foram aumentados no grupo *in vitro*. Fazendo-os concluir que provavelmente existam mecanismos compensatórios nos leitos vasculares de placentas de embriões bovinos produzidos *in vitro*.

5. FERTILIZAÇÃO IN VITRO (FIV)

O avanço das biotecnologias reprodutivas desencadeou a possibilidade de produzir embriões sem levar em consideração o estágio do ciclo estral das doadoras, podendo se repetir o procedimento sem interferir negativamente no número de oócitos recuperados (VARAGO et al., 2008). A obtenção de oócitos a partir de animais vivos, realizada por meio da aspiração folicular transvaginal guiada por ultrassonografia tornou possível a técnica de produção *in vitro* de embriões (FIV) (GARCIA et al., 2004). O advento da técnica tornou a tuba uterina dispensável como órgão de suporte e progressão da gestação (SANDRA et al., 2015).

O principal objetivo comercial da técnica é a obtenção de oócitos de fêmeas que não estão mais aptas a produzir descendentes pelas técnicas convencionais, como doadoras que apresentam infertilidade ou distúrbios patológicos do aparelho reprodutor feminino (BUENO e BELTRAN, 2008), permitindo que oócitos imaturos, recuperados de ovários de doadoras de diferentes idades e estados fisiológico-reprodutivos, sejam fertilizados (GARCIA et al., 2004). Sua aplicação tem causado grande impacto, pois se tornou um instrumento importante para maximização do potencial reprodutivo dos rebanhos, aumentando o número de descendentes, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal (VARAGO et al., 2008).

Os entraves da FIV se devem ao alto custo na produção de embriões, condições inadequadas de cultivo, estado reprodutivo e nutricional das receptoras, além da reduzida criotolerância dos embriões dificultando sua preservação e viabilidade (GARCIA et al., 2004). Durante a fase gestacional, Lonergan et al. (2003) afirmam que a ocorrência de alterações epigenéticas decorrentes de manipulação

no embrião durante o seu desenvolvimento podem comprometer a emissão dos sinais para o reconhecimento materno da gestação, podendo causar prolongamento da gestação.

Os principais problemas da FIV citados na literatura estão relacionados com a “síndrome da prole anormal ou gigante”, as anormalidades relatadas em fetos e bezerros, incluem: taxas de morte prematura embrionária e aborto, produção de fetos e bezerros grandes, deformidades músculo-esqueléticas, crescimento fetal desproporcional, aumento da duração da gestação, edema fetal, crescimento anormal de órgãos, como: coração, cérebro, medula espinhal e músculo esquelético, desenvolvimento anormal da alantóide, alterações na interação materno-fetal e na morfologia de placentomas, anomalias do desenvolvimento da placenta e vasculatura, incluindo hidroalantóide (FARIN et al., 2006).

6. FALHAS GESTACIONAIS

Mortalidade embrionária é uma das principais causas de perdas econômicas em todos os sistemas de produção de ruminantes (DISKIN e MORRIS, 2008). Em humanos, perturbações no diálogo materno-fetal são responsáveis por 60% de todas as perdas gestacionais no período de pré-implantação (MACKLON et al., 2002; HERRLER et al., 2002). Em gestações manipuladas, a ocorrência de falhas na implantação é ainda maior após a fertilização in vitro, ocasionando perdas de 80% a 90% dos embriões humanos (EZRA e SCHENKER, 1995).

Em bovinos, as perdas de gestações são maiores durante o período embrionário (concepção até ao fim da organogênese, dia 1 ao dia 42 da gestação), do que durante o período fetal ou (conclusão da diferenciação de órgãos para o parto, dia 42 a dia 280) ou o período neonatal (parto até dia 28 de vida pós-parto) (FARIN et al., 2006). Estimativas indicam que a taxa de fertilização em bovinos é de 90%, com uma taxa média de partos de cerca de 55%, sugerindo uma mortalidade embrionária/fetal de cerca de 35%; além disso, 70-80% de perda embrionária total está entre dias 8 e 16 após a inseminação (DISKIN et al., 2006).

O estabelecimento da gestação é um processo complexo, pois, além de um ambiente materno adequado, o embrião tem de sinalizar a sua presença e interromper a regressão luteal (BAZER et al., 2010). Os embriões que sobrevivem os períodos iniciais de crescimento são, então, capazes de estabelecer uma gestação (FARIN et al., 2006).

O desenvolvimento adequado do embrião bovino é fundamental para a sinalização positiva do reconhecimento materno da gestação, bem como o desenvolvimento normal do feto e da placenta (FARIN et al., 2006). Para que haja sucesso no desenvolvimento do blastocisto, implantação e manutenção da gravidez, é necessário um diálogo materno-embrionário eficaz, mediado por fatores bioquímicos, como: enzimas, uma variedade de fatores de crescimento e citocinas que permitem as interações complexas durante a implantação entre o embrião e o endométrio materno (EMILIANI et al., 2005). Qualquer perturbação nesta comunicação, pode interromper o progresso da gestação (EMILIANI et al., 2005).

Os embriões produzidos por técnicas de reprodução assistida são geralmente menos aptos e mais propensos a falhas do que embriões produzidos *in vivo* (ISOM et al., 2013). Isto acontece porque os processos de manipulação e cultura de células podem alterar o perfil de expressão dos genes do embrião, conseqüentemente, o seu desenvolvimento e sinalização no endométrio (ZHOU et al., 2008). É importante notar que as perdas significativas de gestações com embriões FIV foram relatadas exatamente durante o período de transição entre as fases embrionária e fetal, especialmente durante os primeiros estágios de desenvolvimento do feto e da placenta de aproximadamente trinta a noventa dias de gestação (FARIN et al., 2006). Isto pode ser atribuído a falhas no desenvolvimento de membranas da placenta e, portanto, reduzido desenvolvimento dos vasos sanguíneos placentários (FARIN et al., 2006).

Alguns autores relataram problemas no que diz respeito ao desenvolvimento de membranas fetais e embrionárias em animais fertilizados *in vitro* e clonados, como, por exemplo, subdesenvolvimento e anormalidades do alantóide (THOMPSON & PETERSON, 2000; DE SOUSA et al., 2001), cório (BERTOLINI et al., 2002; ARNOLD et al., 2008), amnion (MIGLINO et al., 2007; KOHAN-GHADR et

al., 2008) e saco vitelino durante o desenvolvimento embrionário e fetal (DE SOUSA et al., 2001).

Mecanismos que resultem em perdas embrionárias nos primeiros 6 meses de gestação e as possíveis falhas no desenvolvimento de membranas fetais bovinos não são claramente compreendidos (ASSIS NETO et al., 2009). Porém, uma alta taxa de perda gestacional está associada com anormalidades placentárias (WELLS, 2005). Características como: redução no número de placentomas, aumento no tamanho de placentomas e edema das membranas fetais, comprometem as interações materno-fetais e podem causar um impacto negativo sobre o desenvolvimento vascular e nutricional do feto (MIGLINO et al., 2007).

7. EXPRESSÃO GÊNICA

Genomas de mamíferos contêm aproximadamente 20,000-22,000 genes codificadores de proteínas, porém, este número é ainda maior devido a isoformas resultantes de transcritos a partir de um mesmo gene (ULBRICH et al., 2012). A evolução dos mecanismos de implantação, invasão e formação da placenta foi essencial para o sucesso da viviparidade, característica que define os mamíferos (LEFEVRE et al., 2007).

Este processo foi auxiliado pelo recrutamento de uma rede de mais de 1500 genes endometriais, além de genes adicionais ativados devido às numerosas variações evolucionárias que resultaram em diferentes formas de placentação (LYNCH et al., 2011). Durante este período, a expressão e regulação de proteínas específicas do estágio dentro do endométrio são determinantes críticos para o estabelecimento bem sucedido e progresso da gestação (AL-GUBORY et al., 2014).

7.1 Expressão das Aquaporinas 1 (AQP1) e 11 (AQP11)

A água é necessária para que ocorra a maioria das reações bioquímicas nos organismos vivos e compreende mais de 50% do peso do corpo humano adulto. Porém, em embriões, a água é responsável por cerca de 90% de sua composição total. Além disso, no fim da gestação, um volume significativo de água é transferido diariamente da placenta para o feto (STULC, 1997). As aquaporinas (AQP) contribuem significativamente para organizar a distribuição de água em diferentes compartimentos biológicos, tornando-se essenciais durante a gestação humana (ZACCAI, 2004).

O transporte de água através das células pode ocorrer por difusão simples ou através de transportadores especializados, chamados aquaporinas, que são proteínas de membrana intrínsecas e apresentam uma maior capacidade de movimentação de água (AGRE et al., 2002). As aquaporinas constituem uma família de proteínas de membrana hidrofóbicas pequenas (26-30 kDa) e funcionam como canais de água dentro da membrana celular, sua descoberta data de 1991 (AGRE, 2004). Treze membros da família AQP foram descritos em seres humanos até o momento (DAMIANO, 2011).

A aquaporina 1 foi descoberta em células vermelhas do sangue (AGRE et al., 1987; DENKER et al., 1988), e é expressa amplamente em vários tecidos, como rim (NIELSEN e AGRE, 1995), endotélio capilar (NIELSEN et al., 1993), trato genital masculino (BRONW et al., 1993), células do músculo liso vascular (SHANAHAN et al., 1999) e miométrio uterino (LINDSAY e MURPHY, 2004).

Análises de hibridação *in situ* em útero grávido revelaram baixa expressão no estroma endometrial com expressão intensa no miométrio, os quais aumentaram no momento da implantação (RICHARD et al., 2003). A ausência de aquaporina 1 foi demonstrada através de estudos imunohistoquímicos em útero de ratas não grávidas (GANNON et al., 2000). A AQP1 foi encontrada no miométrio circular interno e a sua expressão aumenta no período da implantação (LINDSAY e MURPHY, 2004).

AQP1 foi localizado em placenta e membranas fetais humanas no final da gestação e associada com a regulação de transferência de água na placenta, cório e âmnio (ISHIBASHI et al., 2009). O papel das AQPs na regulação da transferência de água da placenta para o feto e reabsorção intramembranosa ainda é mal compreendido, entretanto, dados experimentais e clínicos suportam a hipótese de que aquaporinas desempenham um papel importante no fluxo fetal de água (ISHIBASHI et al., 2009). Neste sentido, vários estudos têm correlacionado AQP1 com menor transferência placentária de fluido e, conseqüentemente, menor volume de líquido amniótico ou oligodrômio (ZHU et al., 2009).

Estudos demonstraram que AQP11 poderia estar envolvida nos movimentos lentos, porém, constantes de água através das membranas (YAKATA et al., 2011). Em seres humanos, a transcrição da AQP11 foi medida e detectada em coração, bexiga e ureteres (LARSEN et al., 2010). Uma maior expressão da AQP11 nas fases iniciais de gestação (embriogênese) parece estar relacionada com o desenvolvimento de certos órgãos como glândulas salivares, rins ureteres e bexiga e com a transferência lenta de água para o embrião (ESCOBAR et al., 2012). Porém, durante desenvolvimento fetal, a expressão de AQP11 torna-se progressivamente mais baixa até o final da gestação, quando a funcionalidade dos órgãos alcança maturidade e outras AQPs assumem a regulação da água (AQP1, 3, 8, 9) (ESCOBAR et al., 2012). As funções biológicas da AQP11 são distintas do resto da aquaporinas e aquagliceroporinas seu papel durante a gestação merece um estudo mais aprofundado (ESCOBAR et al., 2012).

7.2 Expressão do transportador de glicose 2A1 (SLC2A1)

As células precisam absorver nutrientes continuamente, bem como libertar produtos finais ou metabólicos, para eliminação. A maioria dessas substâncias, mesmo que muito lipofílicas, não são capazes de se difundir através das membranas plasmáticas e, conseqüentemente, precisam de proteínas de transporte para

atravessar os limites da célula (HAGENBUCH e STIEGER, 2013). A superfamília transportadora de soluto (SLC) abrange centenas de proteínas que medeiam a travessia da membrana plasmática de pequenas moléculas ou solutos de vários graus de hidrofiliabilidade e lipofiliabilidade (HEDIGER et al., 2004).

O RNAm de SLC2A1 foi detectado em quase todos os tecidos testados (ROTH et al., 2012) incluindo o cérebro, cólon, coração, rim, fígado, pulmão, ovário, pâncreas, placenta, próstata, músculo esquelético, baço e intestino delgado (SCHUSTER, 2002). Ao nível da proteína, SLC2A1 humana tem demonstrado ser expressa nas células epiteliais da retina e nas camadas de células epiteliais e endoteliais de diferentes tecidos oculares, incluindo o corpo ciliar (KRAFT et al., 2010), no endométrio (KANG et al., 2005), em neurónios, astrócitos e microglia (CHOI et al., 2008), bem como nas células parietais do corpo gástrico e as glândulas do piloro antral (MANDERY et al., 2010).

Um importante nutriente para o conceito (embriões e membranas associadas) e células do útero é a glicose (MOLEY et al., 1998) antes da placentação, a glicose está dispersa no lúmen uterino graças aos transportadores de glicose (LEESE e BARTON, 1984), isto porque, nem o conceito nem endométrio uterino são capazes de realizar gliconeogênese (GAO et al., 2009). Há uma falta de informações na literatura científica sobre transportadores de glicose no útero e conceitos de animais domésticos, tais como ruminantes, no qual os conceitos são submetidos ao rápido crescimento e desenvolvimento durante o período de pré-implantação (GUILLOMOT et al., 1993). No entanto, a expressão de transportadores de glicose no útero e conceito é importante para assegurar a disponibilidade da glicose para o desenvolvimento do embrião e seus anexos (GAO et al., 2009).

Gao et al., (2009) identificaram em seus experimentos, um facilitador do transporte de glicose (SLC2A1) e um transportador de glicose dependente de sódio (SLC5A11), sendo estes, induzidos por progesterona e estimulados por interferon tau, principalmente no epitélio luminal e glandular uterino. Sua expressão é essencial para que ocorra o desenvolvimento do conceito e iniciação do processo de nidificação (GAO et al., 2009).

O membro da família transportadora de soluto (facilitador de transporte de glucose) SLC2A1 pode ser importante para o transporte de glicose no útero do rato e conceito (PANTALEON et al., 1997). Devido à sua natureza ubíqua nos seres humanos (SCHEEPERS et al., 2004) e alta abundância em conceitos bovinos durante a fase de pré-implantação (SANTOS et al., 2000).

7.3 Expressão da glicina amidinotransferase (L – arginina: glycina amidinotransferase) GATM.

A creatina desempenha uma importante função, pois age armazenando energia para a célula, contribuindo para manutenção do metabolismo protéico celular, além de permitir o transporte de energia entre os diferentes componentes celulares, como em órgãos (BORCHEL et al., 2014). O sistema fosfocreatina/creatina age como um tampão rapidamente disponível para o reabastecimento de ATP em órgãos de alta procura energética (CHOE et al., 2013).

O sistema creatina quinase desempenha um papel essencial na homeostase energética durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados, com atividades de destaque em tecidos como o desenvolvimento do SNC e músculos (WALLIMANN et al., 1992). Seus genes são expressos muito precocemente em muitas estruturas de embrião vertebrado (LYONS et al., 1991). Os níveis mais elevados podem, portanto, ser encontrados no músculo esquelético, bem como em espermatozóides e também no cérebro de mamíferos (BORCHEL et al., 2014). Porém, a concentração total de creatina basal é baixa no rim e no fígado (IPSIROGLU et al., 2001).

O GATM é um gene parental que está predominantemente ativo no rim e no pâncreas e em níveis inferiores em outros tecidos, tais como fígado, coração, pulmão, músculo, baço, cérebro, testículos, e o timo (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). O GATM é importante para o desenvolvimento cerebral em humanos e, deficiências na síntese e no transporte de creatina têm sido relacionadas com certas

formas de deficiência mental (BIANCHI et al., 2000). Deficiências extremas de GATM também podem desencadear miopatias graves (EDVARDSON et al., 2010).

A creatina pode ser obtida de forma exógena, a partir da nutrição ou pode ser sintetizada intrinsecamente (BORCHEL et al., 2014). A síntese da creatina é um processo de dois passos que ocorrem principalmente no rim, pâncreas e fígado (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Em uma primeira etapa, L-arginina: amidinotransferase glicina (GATM) sintetiza guanidinoacetato a partir de arginina e glicina (CHOE et al., 2013). Em uma segunda etapa, a enzima guanidinoacetato N-metiltransferase (GAMT) metila guanidinoaminoacetato para formar creatina. Finalmente, a creatina é distribuída e ativamente absorvida pelos diferentes tecidos através do transportador de creatina (SLC6A8) (CHOE et al., 2013). Portanto, GATM é o gene que codifica a enzima que limita a velocidade de síntese da creatina (WYSS e KADDURAH-DAOUK, 2000). Em pelo menos alguns tecidos, o gene é conhecido por ser regulado transcricionalmente por feedback negativo do produto final, a creatina (SANDELL et al., 2003).

Segundo Sandell et al., (2003), o gene GATM é expresso em tecidos embrionários e em extra-embrionários de roedores do gênero *Peromyscus* e nos tecidos extra-embrionários de roedores do gênero *Mus*. Esta expressão na placenta, pode proteger a mãe de picos dramáticos na demanda de energia pelo embrião ou reduzir a perda embrionária pela ausência de recursos maternos, aumentando a eficiência da geração de energia dentro dos tecidos extra-embrionários, levando a crer que a síntese de creatina desempenha um papel importante no desenvolvimento embrionário (SANDELL et al., 2003).

O líquido amniótico contém quantidades significativas de creatina (50 a 100 mM) em fetos humanos, dependendo da idade gestacional (GROENEN et al., 2004). Ela é produzida por células amnióticas (na superfície do cório), e é continuamente renovado por ingestão oral e excreção do feto (BRAISSANT et al., 2005). O líquido amniótico pode, portanto, representar uma maneira fácil de fornecer creatina para muitas estruturas do embrião onde a vasculatura ainda não está totalmente desenvolvida (BRAISSANT et al., 2005).

Tal como na vida adulta, muitos outros tecidos embrionários diferentes mantêm baixos os níveis de GATM e/ou GAMT; verificou-se que os músculos esqueléticos e células epiteliais intestinais estão equipados para sintetizar sua própria creatina expressando tanto GATM como GAMT (BRAISSANT et al., 2005).

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

O presente estudo tem por objetivo identificar o papel do embrião sobre a expressão de *GATM*, *SLC2A1*, *AQP1* e *AQP11* em carúnculas uterinas durante a placentação bovina em gestações obtidas por inseminação artificial e por fertilização *in vitro* (FIV). Verificar se o embrião de fato influencia a expressão gênica, poderá abrir um leque de questões ainda não elucidadas, como por exemplo, quais os sinais do embrião que regulam esse desenvolvimento uterino. Quais achados estão relacionados com as altas taxas de falhas gestacionais observadas em gestações de embriões manipulados em laboratório.

**CAPITULO 1 - MODULATION OF CARUNCULAR GENE EXPRESSION
BY BOVINE EMBRYO DURING PLACENTATION: INFLUENCE ON
METABOLISM AND CELLULAR TRANSPORT.**

ARTIGO A SER SUBMETIDO PARA A REVISTA THERIOGENOLOGY

MODULATION OF CARUNCULAR GENE EXPRESSION BY BOVINE EMBRYO DURING PLACENTATION: INFLUENCE ON METABOLISM AND CELLULAR TRANSPORT.

Kaetillyn Araújo Diniz Silva¹; Laysa Lindaura Lau Rocha Cordeiro¹; Magda Fernandes¹; Luíza Monteiro Almeida¹; Danila Barreiro Campos^{1*}

1. Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil.

*Corresponding author.

Email: danila@cca.ufpb.br

Author profile: Danila B Campos, Departamento de Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Paraíba, Areia, Paraíba, Brasil, CEP 58.397-000. e-mail: danila@cca.ufpb.br.

ABSTRACT

To success of pregnancy is necessary the production of a good embryo and a suitable uterine environment for embryonic development. The interaction between conceptus and uterine endometrium is responsible for creating morphological and functional changes in the embryo and endometrial cells. Embryos produced by assisted reproduction techniques are more prone to failure than the ones *in vivo* produced. In order to determine the influence of bovine embryo on gene expression of *SLC2A1*, *AQP1*, *AQP11* and *GATM* in the placenta, caruncles from the gravid and non-gravid horns were collected from cows submitted to artificial insemination (AI) and *in vitro* fertilization (IVF) at 30, 35 and 40 days of pregnancy. The relative expression of the genes was determined by real time PCR. *AQP1* showed a higher expression in caruncles from gravid horn at 30 and 35 days in AI gestation. In contrast, in IVF pregnancies, *AQP1* expression was decreased in cotyledon-associated caruncles at 35 days. *AQP11* showed a higher expression in cotyledon-

associated caruncles throughout the analyzed period in AI and IVF pregnancies, while *SLC2A1* was more expressed only in cotyledon-associated caruncles from AI pregnancies. A lower expression of *GATM* was observed in caruncles from the gravid horn throughout the analyzed period in AI pregnancies, however this lower expression was observed only at 40 days in IVF pregnancies. The results indicate that the embryo modulates the dynamics of uterine gene expression during placentation, and the manipulation of the embryo can alter the gene expression profile in this period.

Key words - cellular energy; *GATM*; *SLC2A1*; AQPs; in vitro fertilization; artificial insemination.

1. Introduction

The critical period of spontaneous gestations is the initial phase, which is associated with a large number of embryonic loss in all mammalian species [1;2]. In cattle, pregnancy loss is greater during the embryonic period whenever the organogenesis is almost complete [3]. Considering pregnancies of in vitro produced embryos, these losses are even more significant. The recovery rates and detection of the germinal disc at 16 days of pregnancy were 86% and 56% to control embryos and 37% and 35% for in vitro produced embryos [4].

Embryos produced by assisted reproduction techniques are generally less able and more prone to failure than embryos *in vivo* produced [2] because the processes of manipulation and cell culture may alter the expression profile of the embryo's genes and hence its development and signaling to the endometrium [5].

Bovine maternal recognition of pregnancy occurs around 16 days of gestation [6]. This period is characterized by secretion of interferon tau (INF) by the bovine embryo as a sign of its presence in the maternal uterus [7;8]. An important consequence

promoted by this first contact between mother and embryo is the change in maternal physiology to block ovarian cyclicity and to ensure the maintenance of progesterone production by the corpus luteum [9]. The maternal-fetal communication is essential for the establishment of pregnancy and allow the beginning of changes in endometrial cells [7;8] and morphological and functional differentiation of the embryo [9].

For an adequate embryo development and growth is necessary substances like amino acids, glucose, fatty acids, vitamins, minerals and water. Among them, amino acids and glucose are the main sources of embryo energy [10]. The supply of nutrients to the embryo is guaranteed by the mother. The exchange of substances occurred between the maternal and fetal circulation through the placenta have a direct impact on fetal growth [11]. Therefore, the size of the fetus at birth directly reflects the positive transfer of liquids and solutes through the placenta during pregnancy [11].

Many genes influence cellular metabolism and transport exerting direct impact on fetal growth, including aquaporin 1 (*AQP1*) and 11 (*AQP11*), 2A1 glucose transporter (*SLC2A1*) and L-arginine:glycine amidinotransferase (*GATM*). *AQP 1* and *11* are related to the transport and organizing of the water distribution in different biological compartments, which is essential during pregnancy [12]. *SLC2A1*, an important carrier of glucose across the plasma membrane, is expressed in the endometrium and conceptus, being important to ensure bioavailability of glucose during embryo and placental development [10]. *GATM* indirectly participates in protein metabolism encoding an enzyme involved in the biosynthesis of creatine [13]. Creatine works by storing energy for the cell, contributing to cellular protein metabolism maintenance [14].

Most of the time, studies related to maternal and fetal cStudies related to the modulation of these events by the fetus are few [16]. However, the analysis of the transcriptome in endometrial caruncles can provide information about the changes in gene expression dictated by the embryo's presence [17].

The hypothesis that the expression of uterine genes is modulated by the embryo presence during placentation, led us to an analysis of gene expression of molecules involved in the transport and cellular metabolism, such as *AQP1*, *AQP11*, *SLC2A1* and *GATM*, in animals subjected to artificial insemination and in vitro fertilization.

2. Material and methods

2.1 Samples

All experiments and animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use at the Center for Biotechnology (CEUA-CBiotec) of University Federal of Paraíba. The study involved primiparous cows (*Bos indicus*). Fourteen animals were submitted to artificial insemination (AI) and six animals were subjected to the transfer of embryos produced by in vitro fertilization (IVF) using male-sexed semen (*Bos indicus*). Uterine cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn were simultaneously collected at 30 (n = 3), 35 (n = 8) and 40 (n = 3) after insemination, and 35 (n = 3) and 40 (n = 3) days after IVF. Two samples of each horn were stored at -80 °C for later RNA extraction.

2.2 Extraction, RNA purification and reverse transcription

Homogenization and purification of caruncularis tissues were conducted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). DNase I (Qiagen, Valencia, CA) treatment was performed to avoid contamination by genomic DNA. Concentration and purity of RNA samples were accessed by absorbance readings at 260 and 280 nm in NanoDrop spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) . RNA integrity was verified on agarose gel. A sample of 1 ug of total RNA was transcribed

with SuperScript III kit and oligo-dT (Invitrogen, Carlsbad, CA) for analysis of genes by quantitative real time PCR. All procedures were performed according to the manufacturers' recommendations.

2.3 Analysis *AQP1*, *AQP11*, *SLC2A1* and *GATM* gene expression by quantitative PCR in real-time.

Expression of the genes was validated by comparing caruncles collected on day 30 (n = 3), 35 (n = 8) or 40 (n = 3) of pregnancies obtained by AI and caruncles collected on day 35 (n = 3) or 40 (n = 3) obtained by IVF pregnancies. Selected genes were: aquaporins (AQPs) 1 and 11, glucose transporter (SLC2A1) and L-arginine: glycine amidinotransferase (GATM). Expression of these genes in uterine caruncles was evaluated by quantitative real time PCR using the MxPro-Mx3005P model v.4.10 build 389, Schema 85 (Stratagene © 2007, United States). Beta tubulin (TUBB) was used as endogenous control and the bovine oligonucleotides were obtained from previously published sequences (Table 1). SYBR Green PCR Master Mix reagent (Applied Biosystems®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA) was used in the PCR reactions. The conditions for amplification of AQP1, SLC2A1 and GATM genes were 2 minutes at 50 °C and 10 minutes at 95 °C followed by 40 cycles of 95 °C for 15 seconds and 60 °C for 1 minute. For gene AQP11 the protocol used was 2 minutes at 50 °C and 10 minutes at 95 °C followed by 40 cycles of 95 °C for 15 seconds and 62 °C for 1 minute. The specificity of PCR products was assessed by analyzing the dissociation curve. The expression was determined through relative quantification (control of target gene / endogenous control). Data were relatively normalized to a calibrator sample using the $\Delta\Delta C_t$ method with correction for efficiency of amplification [18]. All samples were analyzed in triplicate.

Table 1. Details of the oligonucleotides used in real-time PCR

| Gene (GenBank reference) | Oligonucleotide (5'-3') | Amplicon Size (bp) |
|--------------------------------|--|--------------------|
| <i>AQP11</i> (BC120161.1) | ► GCGGTCATCATAGAGGCTGT ◄ TCGTATCCACCTGCTGTCAG | 97 bp |
| <i>AQP1</i> (BC105525.1) | ► CTGGCCATGATCCTCTTCAT ◄ AGGTGCAGTCCAGGATAACG | 102 bp |
| <i>GATM</i> (BC113272.1) | ► CGCTCGCTTCTTTGAGTACC ◄ CTAAGCCCACAATGGCTGAT | 100 bp |
| <i>SLC2A1</i> (NM_174829.3) | ► TCCCAACCATCTTCCTCATC ◄ TGTGGTGAACCAGGATGAAA | 99 bp |
| <i>TUBB</i> (BT030522.1) | ► CAGCAAGATCCGTGAAGAGT ◄ ACCAGCTGATGGACAGAGAG | 123 bp |
| ► = forward; ◄ = reverse | | |

2.4 Statistical analysis

Relative expression between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horns at the same gestational age and the relative expression between AI and IVF pregnancies in the same gestational age were compared. Data obtained in quantitative real time PCR are presented as mean and standard error. Data was analysed using unpaired bilateral t-test and ANOVA followed by Tukey test. Differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. The GraphPad

Prism software (version 4.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego, CA, USA) was used to perform statistical analysis.

3. Results

AQP1 expression was significantly higher ($P < 0.05$) in cotyledon-associated caruncles at 30 and 35 days of AI gestation (Figure 1). In contrast, a decrease in expression of *AQP1* was observed in caruncles from gravid horn at 35 days of IVF pregnancies.

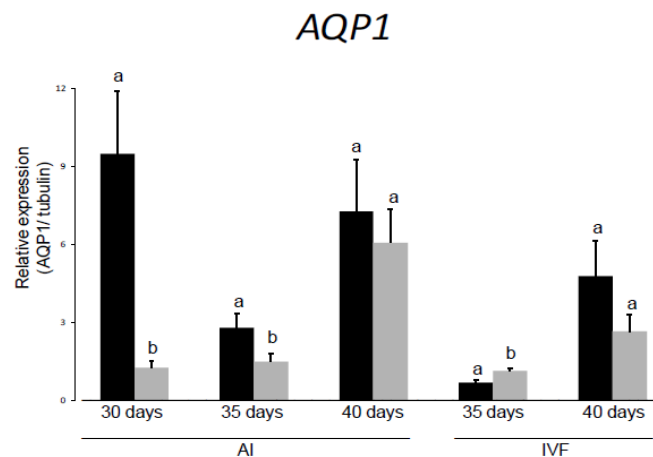


Figure 1. Relative levels of *AQP1* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars). A higher expression of *AQP1* ($p < 0.05$) was observed in cotyledon-associated caruncles at 30 and 35 days in AI gestation. However, there was a decrease of *AQP1* expression in cotyledon-associated caruncles at 35 days in IVF pregnancies. Different letters represent significant differences on average between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P < 0.05$) in the same gestational age. AI: Artificial insemination; IVF: In vitro fertilization.

A higher *AQP11* transcript abundance ($P < 0.05$) was observed in cotyledon-associated caruncles at 30, 35 and 40 days of AI gestations (Figure 2). The same expression pattern, meaning a higher *AQP11* mRNA expression, was observed in cotyledon-associated caruncles at 35 and 40 days of IVF gestations.

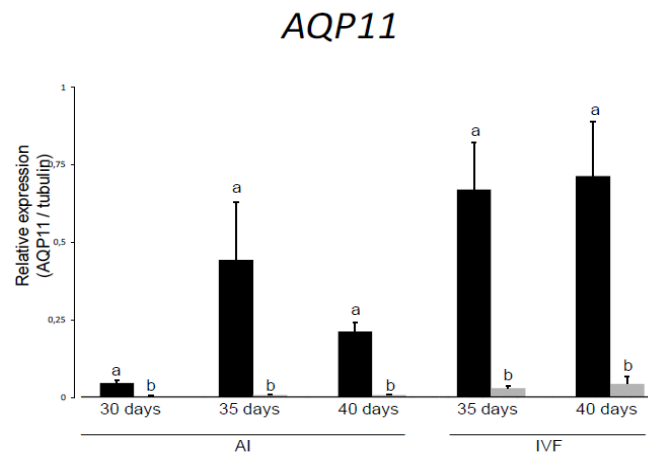


Figure 2. Relative levels of *AQP11* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars). There was a higher *AQP11* expression at 30, 35 and 40 days of AI pregnancies. *AQP11* transcription demonstrated the same pattern in IVF gestations. The different letters represent the significant disparity on average levels between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P < 0.05$) at the same gestational age. AI: artificial insemination; IVF: *in vitro* fertilization.

SLC2A1 transcripts levels were higher in caruncles from gravid horn at 30 and 40 days of AI gestations ($P < 0.05$). Similarly, this expression pattern was observed at 35 days of AI gestations, however, there were no statistical differences. There was also no difference regarding the *SLC2A1* expression in cotyledon-associated caruncles and caruncles non-gravid caruncles at 35 and 40 days in FIV pregnancies (Figure 3).

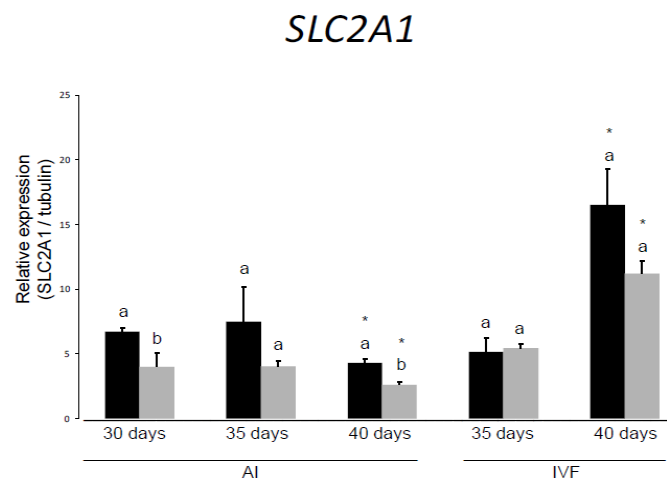


Figure 3. Relative levels of *SLC2A1* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars).

SLC2A1 transcripts were higher in cotyledon-associated caruncles at 30 and 40 days in AI gestations. No differences between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn were detected concerning the *SLC2A1* expression in IVF gestations. The different letters represent the significant disparity on average levels between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P<0,05$) at the same gestational age. The asterisks demonstrate significant differences between AI and IVF ($p<0,05$) averages at the same gestational age. AI: artificial insemination; IVF: *in vitro* fertilization.

GATM mRNA expression showed a significantly lower transcription ($P<0,05$) in cotyledon-associated caruncles when compared to caruncles from non-gravid of AI pregnancies in all periods analysed (30, 35 and 40 days.) On the other hand, in IVF gestations the lower expression observed in caruncles from gravid horns was noted only at 40 days of pregnancy (Figure 4).

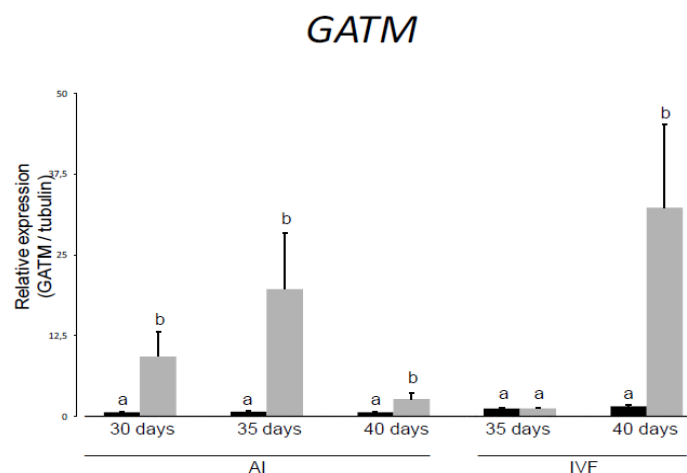


Figure 4. Relative levels of *GATM* transcripts were determined by quantitative real-time PCR in bovine caruncles from non-gravid horn (black bars) and caruncles from non-gravid horn (gray bars). *GATM* presented lower expression in cotyledon-associated caruncles during all analyzed periodo (30, 35 and 40 days) in AI pregnancies. In IVF gestations, the lowest expression of the *GATM* was observed only at 40 days in cotyledon-associated caruncles. The different letters represent the significant disparity on average levels between cotyledon-associated caruncles and caruncles from non-gravid horn ($P<0,05$) at the same gestational age. AI: artificial insemination; IVF: *in vitro* fertilization.

4. Discussion

This study analyzed the mRNA expression of *APQ1*, *AQP11*, *GATM* and *SLC2A1* in bovine uterine caruncles during placentation, seeking to correlate gene expression in gravid and non-gravid horns to identify a possible embryonic influence on this dynamic in AI and IVF pregnancies. The selection of these genes occurred according to their metabolism and cellular transport activities. This research demonstrates that all genes had statistically different expressions in the gravid horn. *AQP1*, *AQP11* and *SLC2A1* showed an increase on the transcription levels and *GATM* was decrease in the horn containing the embryo. Moreover, it was noticed a different pattern of gene expression in pregnancies obtained by AI or IVF.

After the placentation, cellular absorption of glucose through the plasma membrane is mediated by membrane proteins, the glucose carriers [19]. It has been reported before that the *SLC2A1* expressed in the endometrium may be stimulated by the IFNt secreted by lengthened conceptus [20]. In this study, it is observed a higher expression of *SLC2A1* in cotyledon-associated caruncles in AI gestations. The *SLC2A1* crosses the placenta by independent facilitated diffusion of sodium along of a concentration gradient [21]. Soon afterwards, the glucose is converted in CO₂ and water by the aerobic metabolism, releasing energy on its ATP form [22]. The higher expression of the gene in caruncles from gravid horn may be related to the uterine conditions on this gestational phase. As follows, low oxygen conditions raise the *SLC2A1* expression as an adaptive response, increasing glucose capture in the course of periods of oxygen deficiency in the human trophoblast (before 10-12 weeks of gestation) [23]. On the other hand, no statistical difference was noticed between the transcript levels of *SLC2A1* caruncles from gravid and non-gravid horns obtained by IVF. Expression of glucose carriers in the uterus is relevant to ensure glucose availability for development of the embryo and its annexes [10]. Glucose consists the primary substrate for the oxidative metabolism of the fetus [24]. Moreover, glucose stimulates hypertrophy, hyperplasia and cell migration of the trophoctoderm, which proves its extreme importance on the fetal growth [25]. In IVF gestations, several authors stated underdevelopment and anomalies on the

embryonic fetal membranes, including allantois [26; 27], corium [4; 28], amnion [29; 30] and yolk sac [27]. The differences found in the *SLC2A1* expression between AI and IVF pregnancies might suggest that the underdevelopment of these membranes is related to the improper glucose transport. Consequently, the energetic supply is lower on these tissues.

The essential amino acids are precursors of the synthesis of proteins and other biological molecules, including polyamines, nitric oxide, peptides, neurotransmitters, nucleotides and creatine (Cr) [31]. Cr plays an important physiological role because it stores energy to the cell, contributing to the maintenance of the proteic cellular metabolism as well as allowing energy transport between the different cellular components [14]. Biosynthesis of Cr is organized in two steps [13]. Firstly, it occurs the synthesis of the guanidine acetate starting from the L-arginine enzyme: glycine aminotransferase (GATM) combined with arginine and glycine. Sequentially, the guanidine aminoacetate N-methyltransferase enzyme (GAMT) methylates the guanidine acetate to originate the Cr [32]. We verified that *GATM* was less expressed in cotyledon-associated caruncles at all periods (30, 35 and 40 days) of AI pregnancies. The *GATM* could be transcriptionally regulated by a negative feedback of its final product, the creatine (Cr) [13]. Probably, this is the explanation for the lower *GATM* expression in caruncles from gravid horn. In this period fetal Cr is produced by amniotic cells [33]. The amniotic fluid contains significant quantities of Cr (50 to 100 Mm) in human, depending on the gestational age [34]. Additionally, the amniotic fluid may represent an easy way to provide Cr for many embryo structures [33].

The aquaporins (AQP) play an important role during pregnancy because they contribute to establish water distribution in different biological compartments [12]. AQP1 is specifically involved with hydric permeability [36], which contributes to maintain the fluids equilibrium between the mother and the embryo/fetus [38]. In addition, the progesterone may influence AQP1 [38]. On this study, the *AQP1* was more expressed in cotyledon-associated caruncles at 30 and 35 days of AI pregnancies. Yet, a decrease in the *AQP1* expression was observed at 35 days of IVF gestations. Researches have shown that *AQP1* expression is greater in the

implantation period [39;40], when it plays an important role in the stromal oedema and uterine closure, and assist the guiging of the mice blastocyst [40]. It is likely that some other aquaporins work alongside the AQP1 in the placenta throughout the gestation. Beall and collaborators [41] concluded on their experiments that AQP1 seems to regulate the water flow in the fetal membrane. Meanwhile, AQP3 is a potential candidate that regulates the hydric flow in the placenta. Many placental/fetal alterations have been associated with IVF, including hydrallantois and fetal oedema [35]. *AQP1* changes observed in this study during placentation might be related to the future development of these anomalies. AQP11 was recently described and its function is not clearly defined [42]. Our results reveal a higher quantity of *AQP11* transcripts in caruncles from gravid horn at 30, 35 and 40 days of AI gestations. The same *AQP11* expression pattern was noticed in IVF gestations at 35 and 40 days. The abundant *AQP11* expression in the placenta during the initial phases of gestation (embryogenesis) is possibly related to the development of certain embrionic organs, such as salivary glands, ureters, kidneys and urinary bladder [43]. Moreover, this abundant expression is also involved with the slow and constant transport of water through the biological membranes [44]. The biological functions of AQP11 are distinct from the rest of aquaporins and aquaglyceroporins. As a consequence, it is necessary an exclusive and deeper study about is function during the pregnancy [43].

When comparing IVF and AI gestations regarding their gene expression dynamics, it is possible to recognize differences. They may occur due to the exposure of the blastocyst to the culture environment and other conditions that might alter embyo gene expression [45;46;47] and its capability of modulating the endometrium. Extra-embryonic cells when in direct contact with the culture environment are more susceptible to epigenetic modifications [48]. These changes can cause an injury or interrupt the development of the extra-embryonic membranes and of the embryo [49]. Meaningful gestations losses of IVF embryos were reported precisely during the first stages of the embryo and placenta development [35]. Embryos produced *in vitro* are more likely to suffer morphologic alterations and changes on metabolism development timing when compared to *in vivo* produced embryos [50].

5. Conclusions

The results indicate that the presence of the concept might modulate the uterine gene expression dynamic during placentation. This expression may take place in a different manner in gestations obtained by IVF. These differences stated on the normal mRNA expression pattern in IVF embryos could persist all along the fetus evolution and birth, since the effects of a hypothetical procedure may not be manifested during a relatively short period of *in vitro* culture [51].

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was funded by a National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) grant to DBC. The authors thank Ivo Pivatto and Evaldo de Almeida Cardoso for support during artificial insemination, Claudia Marinovic de Oliveira and Ana Carolina Furlanetto Mançanares for providing AI and IVF samples.

REFERENCES

- [1] Diskin MG, Morris DG. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. *Reprod. Domest. Anim.* 2008; 43: 260-267.

- [2] Isom SC, et al. Transcriptional profiling by RNA-Seq of peri-attachment porcine embryos generated by a variety of assisted reproductive technologies. *Physiol. Genomics.* 2013; 45: 577-589.

- [3] Bertolini M, Bertolini LR, Gerger RPC, Batchelder CA, Anderson GB. Developmental problems during pregnancy after in vitro embryo manipulations. *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 2007; 31: 391-405.
- [4] Bertolini M, et al. Morphology and morphometry of in vivo-and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. *Theriogenology*. 2002; 58: 973-994.
- [5] Zhou W, et al. Global gene expression analysis of bovine blastocysts produced by multiple methods. *Mol. Reprod.dev.* 2008; 75: 744-758.
- [6] Forde N, et al. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant?. *Biol. Reprod.* 2011; 85: 144-156.
- [7] Geisert RD, Morgan GL, Short EC, Zavy MT. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. *Reprod. Fétil. Dev.* 1992; 4: 301-305.
- [8] Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW, Burghardt RC. Implantation mechanisms: insights from the sheep. *Reproduction*. 2004; 128: 657-668.
- [9] Ostrup E, Hyttel P, Ostrup O. Embryo–maternal communication: signalling before and during placentation in cattle and pig. *Reprod.Fertil. Dev.* 2011; 23: 964-975.

- [10] Gao H, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Bazer FW. Select nutrients in the ovine uterine lumen. II. Glucose transporters in the uterus and peri-implantation conceptuses. *Biol. Reprod.* 2009; 80: 94-104.
- [11] Desforges M, Sibley CP. Placental nutrient supply and fetal growth. *Int. J. Dev. Biol.* 2010; 54: 377-390.
- [12] Zaccai G. The effect of water on protein dynamics. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 2004; 359: 1269-1275.
- [13] Wyss M, Kaddurah-Daouk R. Creatine and creatinine metabolism. *Physiol. rev.* 2000; 80: 1107-1213.
- [14] Borchel A, Verleih M, Rebl A, Kühn C, Goldammer T. Creatine metabolism differs between mammals and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *SpringerPlus.* 2014; 3: 510.
- [15] Wang H, Dey SK. Roadmap to embryo implantation: clues from mouse models. *Nat. Rev. Genet.* 2006; 7: 185-199.
- [16] Lee KF, Yeung WS. Gamete/embryo–oviduct interactions: implications on in vitro culture. *Human Fertil.* 2006; 9: 137-143.
- [17] Ponsuksili S, Murani E, Schwerin M, Schellander K, Tesfaye D, Wimmers K. Gene expression and DNA-methylation of bovine pretransfer endometrium depending on its receptivity after in vitro-produced embryo transfer. *PloS one.* 2012; 7: e42402-e42402.

- [18] Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic acids res.* 2001; 29: e45-e45.
- [19] Shin BC, Fujikura K, Suzuki T, Tanaka S, Takata K. Glucose transporter GLUT3 in the rat placental barrier: a possible machinery for the transplacental transfer of glucose. *Endocrinology* 1997; 138: 3997-4004.
- [20] Bazer FW, Wu G, Spencer TE, Johnson GA, Burghardt RC, Bayless K. Novel pathways for implantation and establishment and maintenance of pregnancy in mammals. *Mol. human reprod.* 2010; 16: 135-152.
- [21] Gao L, et al. Differential regulation of glucose transporters mediated by CRH receptor type 1 and type 2 in human placental trophoblasts. *Endocrinology.* 2012; 153: 1464-1471.
- [22] Vallet JL, McNeel AK, Johnson G, Bazer FW. Triennial Reproduction Symposium: Limitations in uterine and conceptus physiology that lead to fetal losses. *J. anim. Sci.* 2013; 91: 3030-3040.
- [23] Hayashi M, et al. Induction of glucose transporter 1 expression through hypoxia-inducible factor 1 α under hypoxic conditions in trophoblast-derived cells. *J. Endocrinol.* 2004; 183: 145-154.

- [24] Belkacemi L, Jelks A, Chen CH, Ross MG, Desai M. Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. *Reprod Biol Endocrinol.* 2011; 9: 10-1186.
- [25] Kim JY, Burghardt RC, Wu G, Johnson GA, Spencer TE, Bazer FW. Select nutrients in the ovine uterine lumen. VII. Effects of arginine, leucine, glutamine, and glucose on trophoctoderm cell signaling, proliferation, and migration. *Biol.reprod.* 2011; 84: 62-69.
- [26] Thompson JG, Peterson AJ. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. *Human reprod.* 2000; 15: 59-67.
- [27] De Sousa PA, King T, Harkness L, Young LE, Walker SK, Wilmut I. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. *Biol. Reprod.* 2001; 65: 23-30.
- [28] Arnold DR, Fortier AL, Lefebvre R, Miglino MA, Pfarrer C, Smith LC. Placental insufficiencies in cloned animals—a workshop report. *Placenta.* 2008; 29: 108-110.
- [29] Miglino MA, et al. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. *Theriogenology.* 2007; 68: 604-617.
- [30] Kohan-Ghadr HR, et al. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. *Theriogenology.* 2008; 69: 218-230.

[31] Morris SM. Arginine metabolism: boundaries of our knowledge. *J. Nutr.* 2007; 137: 1602S-1609S.

[32] Choe CU, et al. L-arginine: glycine amidinotransferase deficiency protects from metabolic syndrome. *Hum. Mol. Genet.* 2013; 22: 110-123.

[33] Braissant O, Henry H, Villard AM, Speer O, Wallimann T, Bachmann C. Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CT1. *BMC dev. Biol.* 2005; 5: 9.

[34] Groenen PM, et al. High-resolution ¹H NMR spectroscopy of amniotic fluids from spina bifida fetuses and controls. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 2004; 112: 16-23.

[35] Farin PW, Piedrahita JA, Farin CE. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. *Theriogenology.* 2006; 65: 178-191.

[36] Takata K, Matsuzaki T, Tajika Y, Ablimit A, Hasegawa T. Localization and trafficking of aquaporin 2 in the kidney. *Histochem. cell biol.* 2008; 130: 197-209.

[37] Liu HS, Song XF, Hao RZ. Expression of aquaporin 1 in human placenta and fetal membranes. *J. South. Med. Univers.* 2008; 28: 333-336.

[38] Lindsay LA, Murphy CR. Redistribution of aquaporins 1 and 5 in the rat uterus is dependent on progesterone: a study with light and electron microscopy. *Reproduction*. 2006; 131: 369-378.

[39] Richard C, Gao JU, Brown N, Reese J. Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse. *Endocrinology*. 2003; 144: 1533-1541.

[40] Lindsay LA, Murphy CR. Aquaporin-1 increases in the rat myometrium during early pregnancy. *J. mol. Histol.* 2004; 35: 75-79.

[41] Beall MH, Wang S, Yang B, Chaudhri N, Amidi F, Ross MG. Placental and membrane aquaporin water channels: correlation with amniotic fluid volume and composition. *Placenta*. 2007; 28: 421-428.

[42] Park JI, Yang SH, Lee JP, Yoo SH, Kim YS. Genetic predisposition of donors affects the allograft outcome in kidney transplantation: Single-nucleotide polymorphism of aquaporin-11. *Kidney Res. Clinic. Pract.* 2015; 34: 47-52.

[43] Escobar J, et al. Expression of aquaporins early in human pregnancy. *Early hum. Dev.* 2012; 88: 589-594.

[44] Yakata K, Tani K, Fujiyoshi Y. Water permeability and characterization of aquaporin-11. *J. struct. Biol.* 2011; 174: 315-320.

- [45] Wrenzycki C, et al. Effects of culture system and protein supplementation on mRNA expression in pre-implantation bovine embryos. *Hum. Reprod.* 2001; 16: 893-901.
- [46] Rizos D, et al. Analysis of differential messenger RNA expression between bovine blastocysts produced in different culture systems: implications for blastocyst quality. *Biol. Reprod.* 2002; 66: 589-595.
- [47] Corcoran D, et al. Suppressed expression of genes involved in transcription and translation in in vitro compared with in vivo cultured bovine embryos. *Reproduction.* 2006; 131: 651-660.
- [48] Mann MR, et al. (2004). Selective loss of imprinting in the placenta following preimplantation development in culture. *Development.* 2004; 131: 3727-3735.
- [49] Choux C, Carmignac V, Bruno C, Sagot P, Vaiman D, Fauque P. The placenta: phenotypic and epigenetic modifications induced by Assisted Reproductive Technologies throughout pregnancy. *Clinic. Epigen.* 2015; 7: 1-20.
- [50] Araujo MS, Volpato R, Lopes MD. Produção de embriões bovinos in vitro com sêmen sexado. *Rev. Educ. Cont. Vet. Med. Zootec.* 2013; 11: 8-15.
- [51] Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H. Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. *Reprod. Fertil. Dev.* 2004; 17: 23-35.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho, identificamos a existência de diferentes padrões de expressão gênica durante a placentação e observamos que a presença do embrião bovino pode modular a expressão desses genes no endométrio. Os embriões produzidos por técnicas de reprodução assistida são geralmente mais propensos a falhas do que embriões obtidos por inseminação artificial. Observamos ainda que o nível de transcrição obtido em placentas de gestações com embriões produzidos *in vitro* pode ser muito inferior se comparado com gestações oriundas de inseminação artificial.

Tais mecanismos aqui expostos poderão auxiliar na compreensão das diversas causas de falhas gestacionais, em que, embriões manipulados em laboratório apresentam maior suscetibilidade. Alterações na morfologia embrionária, expressão gênica fetal e desenvolvimento feto/placentária, estão relacionados à manipulação necessária para a obtenção de embriões produzidos em laboratório. Esperamos que este estudo fomente a elaboração de técnicas que otimizem as taxas de nascimento de embriões submetidos a biotecnologias da reprodução.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRE, Peter. Aquaporin water channels. **Bioscience reports**, v. 24, n. 3, p. 127-163, 2004.

AGRE, Peter et al. Aquaporin water channels—from atomic structure to clinical medicine. **The Journal of physiology**, v. 542, n. 1, p. 3-16, 2002.

AGRE, Peter et al. Purification and partial characterization of the Mr 30,000 integral membrane protein associated with the erythrocyte Rh (D) antigen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 36, p. 17497-17503, 1987.

AL-GUBORY, Kaïs H. et al. Proteomic analysis of the sheep caruncular and intercaruncular endometrium reveals changes in functional proteins crucial for the establishment of pregnancy. **Reproduction**, v. 147, n. 5, p. 599-614, 2014.

ALVAREZ-OXILEY, Andrea V.; DE SOUSA, Noelita M.; BECKERS, Jean-François. Native and recombinant bovine placental lactogens. **Reproductive biology**, v. 8, n. 2, p. 85-106, 2008.

ASSIS NETO, Antônio C. de et al. Biometrics evolution of the embryonic and fetal annexes in cows obtained by natural mating, at 10 to 70 days of gestation. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 10, p. 859-862, 2009.

ARNOLD, D. R. et al. Placental insufficiencies in cloned animals—a workshop report. **Placenta**, v. 29, p. 108-110, 2008.

ATKINSON, B. A.; KING, G. J.; AMOROSO, E. C. Development of the caruncular and intercaruncular regions in the bovine endometrium. **Biology of reproduction**, v. 30, n. 3, p. 763-774, 1984.

BAUERSACHS, S. et al. Transcriptome studies of bovine endometrium reveal molecular profiles characteristic for specific stages of estrous cycle and early pregnancy. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes**, v. 116, n. 7, p. 371, 2008.

BAUERSACHS, Stefan et al. Embryo-induced transcriptome changes in bovine endometrium reveal species-specific and common molecular markers of uterine receptivity. **Reproduction**, v. 132, n. 2, p. 319-331, 2006.

BAUERSACHS, Stefan et al. Comparison of the effects of early pregnancy with human interferon, alpha 2 (IFNA2), on gene expression in bovine endometrium. **Biology of reproduction**, v. 86, n. 2, p. 46, 2012.

BAZER, Fuller W. et al. Comparative aspects of implantation. **Reproduction**, v. 138, n. 2, p. 195-209, 2009.

BAZER, F. W. et al. Uterine receptivity to implantation of blastocysts in mammals. **Frontiers in bioscience (Scholar edition)**, v. 3, p. 745-767, 2010.

BAZER, Fuller W.; SIMMEN, Rosalia; SIMMEN, Frank A. Comparative Aspects of Conceptus Signals for Maternal Recognition of Pregnancy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 622, n. 1, p. 202-211, 1991.

BAZER, Fuller W.; SPENCER, Thomas E.; OTT, Troy L. Interferon tau: a novel pregnancy recognition signal. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 37, n. 6, p. 412-420, 1997.

BELTMAN, Marijke Eileen et al. Global proteomic characterization of uterine histotroph recovered from beef heifers yielding good quality and degenerate day 7 embryos. **Domestic animal endocrinology**, v. 46, p. 49-57, 2014.

BERTOLINI, Marcelo et al. Morphology and morphometry of in vivo-and in vitro-produced bovine concepti from early pregnancy to term and association with high birth weights. **Theriogenology**, v. 58, n. 5, p. 973-994, 2002.

BIANCHI, Maria Cristina et al. Reversible brain creatine deficiency in two sisters with normal blood creatine level. **Annals of neurology**, v. 47, n. 4, p. 511-513, 2000.

BJÖRKMAN, N.; DELLMANN, H. D.; BROWN, E. Placentação. **DELMANN HP AND BROWN EM. Histologia Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 279-294, 1982.

BJÖRKMAN, N., DELLMANN, H., & BROWN, E. Placentation. **DELMANN HP AND BROWN EM. Textbook of veterinary histology. Philadelphia: lippincott Williams & Wilkins**, p. 351-369, 1976.

BJÖRKMAN, Nils H. Fine structure of cryptal and trophoblastic giant cells in the bovine placentome. **Journal of ultrastructure research**, v. 24, n. 3, p. 249-258, 1968.

BORCHEL, Andreas et al. Creatine metabolism differs between mammals and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **SpringerPlus**, v. 3, n. 1, p. 510, 2014.

BRAISSANT, Olivier et al. Creatine synthesis and transport during rat embryogenesis: spatiotemporal expression of AGAT, GAMT and CT1. **BMC developmental biology**, v. 5, n. 1, p. 9, 2005.

BUENO, Ataliba Perina; BELTRAN, Maria Paula. Produção in vitro de embriões bovinos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v. 6, n. 11, 2008.

CARSON, Daniel D. et al. Embryo implantation. **Developmental biology**, v. 223, n. 2, p. 217-237, 2000.

CHOE, Chi-un et al. L-arginine: glycine amidinotransferase deficiency protects from metabolic syndrome. **Human molecular genetics**, v. 22, n. 1, p. 110-123, 2013.

CHOI, Koyi et al. Expression and localization of prostaglandin transporter in Alzheimer disease brains and age-matched controls. **Journal of neuroimmunology**, v. 195, n. 1, p. 81-87, 2008.

DAMIANO, A. E. Review: Water channel proteins in the human placenta and fetal membranes. **Placenta**, v. 32, p. S207-S211, 2011.

DENKER, Bradley M. et al. Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 30, p. 15634-15642, 1988.

DE SOUSA, Paul A. et al. Evaluation of gestational deficiencies in cloned sheep fetuses and placentae. **Biology of reproduction**, v. 65, n. 1, p. 23-30, 2001.

DESFORGES, Michelle; SIBLEY, Colin P. Placental nutrient supply and fetal growth. **Int J Dev Biol**, v. 54, n. 2-3, p. 377-390, 2010.

DISKIN, M. G.; MORRIS, D. G. Embryonic and early foetal losses in cattle and other ruminants. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s2, p. 260-267, 2008.

DISKIN, M. G.; MURPHY, J. J.; SREENAN, J. M. Embryo survival in dairy cows managed under pastoral conditions. **Animal reproduction science**, v. 96, n. 3, p. 297-311, 2006.

EDVARDSON, Simon et al. l-arginine: glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: clinical presentation and response to treatment in two patients with a novel mutation. **Molecular genetics and metabolism**, v. 101, n. 2, p. 228-232, 2010.

EMILIANI, Serena et al. Embryo–maternal interactive factors regulating the implantation process: implications in assisted reproductive treatment. **Reproductive biomedicine online**, v. 10, n. 4, p. 527-540, 2005.

ENDERS, A. C.; CARTER, A. M. Comparative placentation: some interesting modifications for histotrophic nutrition—a review. **Placenta**, v. 27, p. 11-16, 2006.

ESCOBAR, Javier et al. Expression of aquaporins early in human pregnancy. **Early human development**, v. 88, n. 8, p. 589-594, 2012.

EZRA, Y.; SCHENKER, J. G. Abortion rate in assisted reproduction--true increase?. **Early pregnancy: biology and medicine: the official journal of the Society for the Investigation of Early Pregnancy**, v. 1, n. 3, p. 171-175, 1995.

FABER, J. Job; THORNBURG, Kent L. **Placental physiology: structure and function of fetomaternal exchange**. Raven Press, 1983.

FARIN, Peter W.; PIEDRAHITA, Jorge A.; FARIN, Charlotte E. Errors in development of fetuses and placentas from in vitro-produced bovine embryos. **Theriogenology**, v. 65, n. 1, p. 178-191, 2006.

FAZELI, Alireza; PEWSEY, Emma. Maternal communication with gametes and embryos: a complex interactome. **Briefings in functional genomics & proteomics**, v. 7, n. 2, p. 111-118, 2008.

FORD, S. P. Cotyledonary placenta. **Encyclopedia of reproduction**, v. 1, p. 730-738, 2000.

FORDE, N. et al. Conceptus-induced changes in the endometrial transcriptome: how soon does the cow know she is pregnant?. **Biology of Reproduction**, v. 85, n. 1, p. 144-156, 2011.

GANNON, Brendan John et al. Aquaporin-1 expression in visceral smooth muscle cells of female rat reproductive tract. **Journal of Smooth Muscle Research**, v. 36, n. 5, p. 155-167, 2000.

GAO, Haijun et al. Select nutrients in the ovine uterine lumen. II. Glucose transporters in the uterus and peri-implantation conceptuses. **Biology of reproduction**, v. 80, n. 1, p. 94-104, 2009.

GARCIA, J. M.; AVELINO, K. B.; VANTINI, R. Estado da arte da fertilização in Vitro em bovinos. In: **Annals of the First International Symposium on Animal Reproduction Applied: 14-16 October 2004; Londrina**. 2004. p. 223-230.

GEISERT, R. D. et al. Endocrine events associated with endometrial function and conceptus development in cattle. **Reproduction, fertility and development**, v. 4, n. 3, p. 301-305, 1992.

GROENEN, Pascal MW et al. High-resolution ¹H NMR spectroscopy of amniotic fluids from spina bifida fetuses and controls. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 112, n. 1, p. 16-23, 2004.

GROSS, T. S.; WILLIAMS, W. F. Bovine placental prostaglandin synthesis: principal cell synthesis as modulated by the binucleate cell. **Biology of reproduction**, v. 38, n. 5, p. 1027-1034, 1988.

GUILLOMOT, M. Cellular interactions during implantation in domestic ruminants. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 49, p. 39-51, 1994.

HAGENBUCH, Bruno; STIEGER, Bruno. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters. **Molecular aspects of medicine**, v. 34, n. 2, p. 396-412, 2013.

HAMBRUCH, N. et al. EGF stimulates proliferation in the bovine placental trophoblast cell line F3 via Ras and MAPK. **Placenta**, v. 31, n. 1, p. 67-74, 2010.

HASHIZUME, Kazuyoshi et al. Implantation and placental development in somatic cell clone recipient cows. **Cloning & Stem Cells**, v. 4, n. 3, p. 197-209, 2002.

HEDIGER, Matthias A. et al. The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins. **Pflügers Archiv**, v. 447, n. 5, p. 465-468, 2004.

HERRLER, Andreas; VON RANGO, Ulrike; BEIER, Henning M. Embryo-maternal signalling: how the embryo starts talking to its mother to accomplish implantation. **Reproductive biomedicine online**, v. 6, n. 2, p. 244-256, 2003.

IPSIROGLU, Osman S. et al. Changes of tissue creatine concentrations upon oral supplementation of creatine-monohydrate in various animal species. **Life sciences**, v. 69, n. 15, p. 1805-1815, 2001.

ISHIBASHI, Kenichi; HARA, Shigeki; KONDO, Shintaro. Aquaporin water channels in mammals. **Clinical and experimental nephrology**, v. 13, n. 2, p. 107-117, 2009.

ISOM, S. Clay et al. Transcriptional profiling by RNA-Seq of peri-attachment porcine embryos generated by a variety of assisted reproductive technologies. **Physiological genomics**, v. 45, n. 14, p. 577-589, 2013.

JAINUDEEN, M. R.; HAFEZ, E. S. E. Reproductive failure in females. **Reproduction In Farm Animals. 6th ed. Lea & Febiger, Philadelphia**, p. 261-286, 1993.

KANG, Jihong et al. Expression of human prostaglandin transporter in the human endometrium across the menstrual cycle. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 4, p. 2308-2313, 2005.

KRAFT, Michaela E. et al. The prostaglandin transporter OATP2A1 is expressed in human ocular tissues and transports the antiglaucoma prostanoid latanoprost. **Invest Ophthalmol Vis Sci**, v. 51, n. 5, p. 2504-2511, 2010.

KESSLER, MARK A.; DUELLO, THERESA M.; SCHULER, LINDA A. Expression of Prolactin-Related Hormones in the Early Bovine Conceptus, and Potential for Paracrine Effect on the Endometrium*. **Endocrinology**, v. 129, n. 4, p. 1885-1895, 1991.

KOHAN-GHADR, H. R. et al. Ultrasonographic and histological characterization of the placenta of somatic nuclear transfer-derived pregnancies in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 69, n. 2, p. 218-230, 2008.

LARSEN, Helga S. et al. Aquaporin 11 in the developing mouse submandibular gland. **European journal of oral sciences**, v. 118, n. 1, p. 9-13, 2010.

LEE, Kevin Y.; DEMAYO, Francesco J. Animal models of implantation. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 679-695, 2004.

LEFÈVRE, Pavine; CAMPOS, Danila B.; MURPHY, Bruce D. Talk to me: the embryo dictates gene expression by the endometrium. **Endocrinology**, v. 148, n. 9, p. 4170-4172, 2007.

LEESE, H. J.; BARTON, Alison M. Pyruvate and glucose uptake by mouse ova and preimplantation embryos. **Journal of reproduction and fertility**, v. 72, n. 1, p. 9-13, 1984.

LEISER, R.; KAUFMANN, P. Placental structure: in a comparative aspect. **Experimental and clinical endocrinology**, v. 102, n. 3, p. 122-134, 1993.

LINDSAY, Laura A.; MURPHY, Christopher R. Aquaporin-1 increases in the rat myometrium during early pregnancy. **Journal of molecular histology**, v. 35, n. 1, p. 75-79, 2004.

LONERGAN, P. et al. Temporal divergence in the pattern of messenger RNA expression in bovine embryos cultured from the zygote to blastocyst stage in vitro or in vivo. **Biology of Reproduction**, v. 69, n. 4, p. 1424-1431, 2003.

LYNCH, Vincent J. et al. Transposon-mediated rewiring of gene regulatory networks contributed to the evolution of pregnancy in mammals. **Nature genetics**, v. 43, n. 11, p. 1154-1159, 2011.

LYONS, G. E. et al. Developmental regulation of creatine kinase gene expression by myogenic factors in embryonic mouse and chick skeletal muscle. **Development**, v. 113, n. 3, p. 1017-1029, 1991.

MACKLON, Nick S.; GERAEDTS, Joep PM; FAUSER, Ban CJM. Conception to ongoing pregnancy: the 'black box' of early pregnancy loss. **Human Reproduction Update**, v. 8, n. 4, p. 333-343, 2002.

MAMO, Solomon et al. RNA sequencing reveals novel gene clusters in bovine conceptuses associated with maternal recognition of pregnancy and implantation. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 6, p. 1143-1151, 2011.

MANDERY, Kathrin et al. Influence of cyclooxygenase inhibitors on the function of the prostaglandin transporter organic anion-transporting polypeptide 2A1 expressed in human gastroduodenal mucosa. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 345-351, 2010.

MANSOURI-ATTIA, Nadéra et al. Endometrium as an early sensor of in vitro embryo manipulation technologies. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 14, p. 5687-5692, 2009.

MIGLINO, M. A. et al. Placentation in cloned cattle: structure and microvascular architecture. **Theriogenology**, v. 68, n. 4, p. 604-617, 2007.

MILES, Jeremy R. et al. Angiogenesis and morphometry of bovine placentas in late gestation from embryos produced in vivo or in vitro. **Biology of reproduction**, v. 71, n. 6, p. 1919-1926, 2004.

MOLEY, K. H. et al. Hyperglycemia induces apoptosis in pre-implantation embryos through cell death effector pathways. **Nature medicine**, v. 4, n. 12, p. 1421-1424, 1998.

NAKANO, Haruo et al. Bovine trophoblastic cell differentiation on collagen substrata: formation of binucleate cells expressing placental lactogen. **Cell and tissue research**, v. 307, n. 2, p. 225-235, 2002.

SANTOS, Anne Naverrete et al. The insulin-dependent glucose transporter isoform 4 is expressed in bovine blastocysts. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 271, n. 3, p. 753-760, 2000.

NIELSEN, Soren; AGRE, Peter. The aquaporin family of water channels in kidney. **Kidney international**, v. 48, n. 4, p. 1057-1068, 1995.

NIELSEN, Soren et al. Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 90, n. 15, p. 7275-7279, 1993.

OSTRUP, Esben; HYTTEL, Poul; ØSTRUP, Olga. Embryo–maternal communication: signalling before and during placentation in cattle and pig. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 23, n. 8, p. 964-975, 2011.

PANTALEON, M. et al. Glucose transporter GLUT3: ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 8, p. 3795-3800, 1997.

PEREIRA, F. T. V. et al. Fusão caruncular em vacas prenhes. **Acta Sci Vet**, v. 34, p. 586, 2006.

PEREIRA, Flavia Thomaz Verechia et al. Fetal-Maternal Interactions in the Synepitheliochorial Placenta Using the eGFP Cloned Cattle Model. **PLoS ONE**, v. 8, p. 64399, 2013.

PETER, Augustine T. Bovine placenta: a review on morphology, components, and defects from terminology and clinical perspectives. **Theriogenology**, v. 80, n. 7, p. 693-705, 2013.

REIMERS, T. J.; ULLMANN, M. B.; HANSEL, W. Progesterone and prostanoid production by bovine binucleate trophoblastic cells. **Biology of reproduction**, v. 33, n. 5, p. 1227-1236, 1985.

RICI, R. E. G. et al. Evaluation of the contribution of the placentomal fusion during gestation in cattle. **Animal reproduction science**, v. 126, n. 3, p. 143-150, 2011.

RICHARD, Charissa et al. Aquaporin water channel genes are differentially expressed and regulated by ovarian steroids during the periimplantation period in the mouse. **Endocrinology**, v. 144, n. 4, p. 1533-1541, 2003.

ROBINSON, R. S. et al. Corpus luteum–endometrium–embryo interactions in the dairy cow: underlying mechanisms and clinical relevance. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s2, p. 104-112, 2008.

ROTH, Megan; OBAIDAT, Amanda; HAGENBUCH, Bruno. OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. **British journal of pharmacology**, v. 165, n. 5, p. 1260-1287, 2012.

SANDELL, Lisa L. et al. Gcm, a creatine synthesis enzyme, is imprinted in mouse placenta. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 8, p. 4622-4627, 2003.

SANDRA, Olivier et al. Maternal organism and embryo biosensing: insights from ruminants. **Journal of reproductive immunology**, v. 108, p. 105-113, 2015.

SCHEEPERS, Andrea; JOOST, Hans-Georg; SCHURMANN, Annette. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 28, n. 5, p. 364-371, 2004.

SCHLAFER, D. H.; FISHER, P. J.; DAVIES, C. J. The bovine placenta before and after birth: placental development and function in health and disease. **Animal reproduction science**, v. 60, p. 145-160, 2000.

SCHUSTER, Victor L. Prostaglandin transport. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 68, p. 633-647, 2002.

SHANAHAN, Catherine M. et al. Aquaporin-1 is expressed by vascular smooth muscle cells and mediates rapid water transport across vascular cell membranes. **Journal of vascular research**, v. 36, n. 5, p. 353-362, 1999.

SIITERI, Pentti K. et al. PROGESTERONE AND MAINTENANCE OF PREGNANCY: IS PROGESTERONE NATURE'S IMMUNOSUPPRESSANT?*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 286, n. 1, p. 384-397, 1977.

SPENCER, Thomas E.; SANDRA, Olivier; WOLF, Eckhard. Genes involved in conceptus–endometrial interactions in ruminants: insights from reductionism and thoughts on holistic approaches. **Reproduction**, v. 135, n. 2, p. 165-179, 2008.

SPENCER, T. E.; BAZER, F. W. Uterine and placental factors regulating conceptus growth in domestic animals. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 13_suppl, p. E4-E13, 2004.

SPENCER, Thomas E. et al. Implantation mechanisms: insights from the sheep. **Reproduction**, v. 128, n. 6, p. 657-668, 2004.

STULC, Jan. Placental transfer of inorganic ions and water. **Physiological reviews**, v. 77, n. 3, p. 805-836, 1997.

THOMPSON, E. M. Chromatin structure and gene expression in the preimplantation mammalian embryo. **Reproduction Nutrition Development**, v. 36, n. 6, p. 619-635, 1996.

THOMPSON, Jeremy G.; PETERSON, A. Jim. Bovine embryo culture in vitro: new developments and post-transfer consequences. **Human reproduction**, v. 15, n. suppl 5, p. 59-67, 2000.

ULBRICH, Susanne E.; GROEBNER, Anna E.; BAUERSACHS, Stefan. Transcriptional profiling to address molecular determinants of endometrial receptivity—lessons from studies in livestock species. **Methods**, v. 59, n. 1, p. 108-115, 2013.

VARAGO, F. C.; MENDONÇA, L. F.; LAGARES, M. A. Produção in vitro de embriões bovinos: estado da arte e perspectiva de uma técnica em constante evolução. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 32, n. 2, p. 100-109, 2008.

WALLIMANN, Theo et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. **Biochemical Journal**, v. 281, n. Pt 1, p. 21, 1992.

WELLS, D. N. Animal cloning: problems and prospects. **Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties**, v. 24, n. 1, p. 251, 2005.

WOODING, F. B. P. The synepitheliochorial placenta of ruminants: binucleate cell fusions and hormone production. **Placenta**, v. 13, n. 2, p. 101-113, 1992.

WOODING, F. B. P.; BECKERS, Jean-François. Trinucleate cells and the ultrastructural localisation of bovine placental lactogen. **Cell and tissue research**, v. 247, n. 3, p. 667-673, 1987.

WYSS, Markus; KADDURAH-DAOUK, Rima. Creatine and creatinine metabolism. **Physiological reviews**, v. 80, n. 3, p. 1107-1213, 2000.

YAKATA, Kaya; TANI, Kazutoshi; FUJIYOSHI, Yoshinori. Water permeability and characterization of aquaporin-11. **Journal of structural biology**, v. 174, n. 2, p. 315-320, 2011.

ZACCAI, G. The effect of water on protein dynamics. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1448, p. 1269-1275, 2004.

ZHOU, Wenli et al. Global gene expression analysis of bovine blastocysts produced by multiple methods. **Molecular reproduction and development**, v. 75, n. 5, p. 744-758, 2008.

ZHU, X. Q. et al. Expression of aquaporin 1 and aquaporin 3 in fetal membranes and placenta in human term pregnancies with oligohydramnios. **Placenta**, v. 30, n. 8, p. 670-676, 2009.